UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

DEBORAH CEZAR MENDONÇA

Automontagem de filamentos de septinas estudada por microscopia eletrônica de
transmissão

São Carlos
2018

DEBORAH CEZAR MENDONÇA

Automontagem de filamentos de septinas estudada por microscopia eletrônica de transmissão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Mendonça, Deborah Cezar

Automontagem de filamentos de septinas estudada por microscopia eletrônica de transmissão / Deborah Cezar Mendonça; orientador Richard Charles Garratt - versão corrigida -- São Carlos, 2018.

93 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2018.

1. Septinas. 2. Microscopia eletrônica de transmissão. 3. Análise de partícula única. I. Garratt, Richard Charles, orient. II. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, Maurici e Cristina, por todo incentivo e apoio à todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Richard Charles Garratt, pela oportunidade e apoio desde a minha graduação. Por me incentivar e fazer com que fosse possível todo esse novo aprendizado, descobertas, discussões e por ser uma inspiração e exemplo de pesquisador.

Às técnicas e colegas do laboratório de Biofísica pelo espaço e ajuda nas purificações. À Prof. Dr. Ana Paula U. Araújo pelo apoio e colaboração durante todo o mestrado. À Dr. Joci pelas explicações no início e todo o trabalho anterior que permitiu a realização deste projeto. À Sinara por ceder suas amostras para medidas de microscopia.

Ao pessoal do LNNano, pela colaboração e amizade construída nesses dois anos. Marcelo e Alfredo pelos cafés e risadas. Ao Alexandre Cassago pelos treinamentos e colaboração. Em especial, ao Dr. Rodrigo Portugal, por toda a paciência e empenho em me ensinar tudo sobre microscopia e processamento, pela co-orientação e conselhos. E Dr. Marin van Heel por compartilhar seu conhecimento, pelas discussões e por ser também uma inspiração.

Aos amigos, agradeço pelas diversões, festas, conversas, desabafos, conselhos e por deixar a vida mais leve. Em especial, Raquel, Kleber, Maggoo e Bird.

Ao meu namorado, Henrich, por aguentar meu desespero, me acalmar quando eu achava que ia dar tudo errado ou estava cheia de dúvidas, por me incentivar sempre e por ser minha alegria de todos os dias, te amo.

Aos meus pais, Maurici e Cristina, meu irmão Gu, vó Marilene e todos os familiares que me fazem muita falta e que sempre me apoiaram, mesmo de longe. Vocês são tudo para mim, amo vocês.

Obrigada a todos que colaboraram pela minha evolução profissional e pessoal e que me apoiaram durante o mestrado.

Ao Instituto de Física de São Carlos, por toda estrutura.

Às agências de fomento CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro.

“For long you live and high you fly
and smiles you'll give and tears you'll cry,
all you touch and all you see is all your life will ever be.”
BREATHE / PINK FLOYD

RESUMO

MENDONÇA, D. C. **Automontagem de filamentos de septinas estudada por microscopia eletrônica**. 2018. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Septinas são GTPases consideradas como um novo componente do citoesqueleto. Essas proteínas interagem entre si para formar heterocomplexos filamentosos e estruturas de alta ordem que são importantes para a citocinese e uma variedade de outros processos celulares. Existem muitos aspectos mecânicos dessas proteínas que não são totalmente compreendidos, incluindo a forma como os heterocomplexos se agrupam corretamente. Em humanos, há 13 genes que codificam septinas, classificadas em quatro grupos quanto à similaridade em relação à estrutura primária. O complexo hexamérico SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7 foi o melhor caracterizado, com uma estrutura cristalina resolvida à 4 Å. Segundo as Regras de Kinoshita, as septinas desse complexo podem ser substituídas nesse arranjo por outras pertencentes ao mesmo grupo. Neste trabalho utilizamos a técnica de microscopia eletrônica de transmissão com análise de partícula única para estudar dois complexos de septinas. Um dos complexos estudados neste projeto é formado por septinas humanas, para as quais atualmente não há informações estruturais disponíveis. O complexo SEPT5-SEPT6-SEPT7 foi expresso heterologicamente em *E. coli* e purificado em alta concentração salina para evitar a polimerização. A análise de partículas únicas de imagens por contrastação negativa mostrou a presença de partículas alongadas de aproximadamente 25 nm de comprimento, compostos por seis monômeros, como esperado. Com o objetivo de localizar a posição da SEPT5 no complexo, foi realizada uma fusão com MBP (Maltose Binding Protein) e imunomarcação com anticorpo monoclonal anti-SEPT5, concluindo que a SEPT5 está localizada na extremidade do complexo hexamérico. Porém, a SEPT5 pertence ao mesmo grupo da SEPT2, que foi relatada estar localizada no centro do hexâmero. Este resultado possibilitou uma nova discussão sobre a maneira que as septinas formam os complexos e, como a sensibilidade à concentração salina está relacionada com a fragilidade da interface NC, análogo ao observado em complexos de *Saccharomyces cerevisiae*. Um complexo de *Ciona intestinalis* incluindo a SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT9, também expresso heterologicamente em *E. coli*, foi preparado por contrastação negativa. A análise de partícula única das imagens coletadas mostrou um heterocomplexo aparentemente hexamérico, embora fosse esperado um octâmero devido à presença das quatro septinas diferentes, sendo uma pertencente à cada um dos quatro grupos. Os resultados deste trabalho proporcionaram um avanço na compreensão da formação de heterocomplexos de septinas e como essas proteínas interagem umas com as outras nesta montagem.

Palavras-chave: Septinas. Microscopia eletrônica de transmissão. Análise de partícula única.

ABSTRACT

MENDONÇA, D. C. **Self-assembling of septine filaments studied by electron microscopy**. 2018. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Septins are GTPases that appear to be a novel component of the cytoskeleton. These proteins interact with each other to form filamentous heterocomplexes and high order structures which are important for cytokinesis and a variety of other cellular processes. There are many mechanistic aspects of these proteins that are not fully understood, including how the heterocomplexes correctly assemble. In humans, there are 13 genes encoding septins, classified in four groups based on primary structure. The SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7 hexameric complex was the best characterized, with a crystalline structure solved at 4Å. According to Kinoshita's Rules, the septins of this complex can be replaced in this arrangement by others belonging to the same group. In this work, we used transmission electron microscopy with single particle analysis to study two septin complexes. One of the complexes studied in this project is composed of three human septins, for which there is currently no structural information available. The SEPT5-SEPT6-SEPT7 complex was heterologously expressed in *E. coli* and purified at high salt concentration to avoid polymerization. Single particle analysis of negatively stained samples showed the presence of elongated particles of approximately 25 nm in length. To locate SEPT5 in the complex, a fusion with MBP (Maltose Binding Protein) and immunoblotting with anti-SEPT5 monoclonal antibody was performed, concluding that SEPT5 is located at the end of the hexameric complex. However, SEPT5 belongs to the same group as SEPT2, which was reported to be located in the center of the hexamer. This result allowed for a new discussion on the way that septins form heterocomplexes and also, on how the sensitivity of the NC interface is related to salt concentration, analogous to that observed in the heterocomplex of *Saccharomyces cerevisiae*. A *Ciona intestinalis* complex including SEPT2, SEPT6, SEPT7 and SEPT9, also expressed heterologously in *E. coli*, was prepared by negative staining. The single particle analysis of the collected images showed an apparently hexameric heterocomplex, although an octamer was expected due to the presence of the four different septins, one belonging to each of the four groups. The results of this work represent advances in the understanding of the formation of septin heterocomplexes and how these proteins interact with each other during assembly.

Keywords: Septins. Transmission electron microscopy. Single particle analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Localização das septinas no processo de divisão celular em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . A) Microscopia eletrônica com escala representando 0.1 μm . B) Imunofluorescência evidenciando a presença das septinas nas etapas do ciclo celular, primeiramente formando um anel que circula o sítio de brotamento nos estágios finais da etapa G1, até a separação entre a célula-mãe da célula-filha.....	28
Figura 2 -	Funções diversas das septinas, atuando como “andaimes proteicos” ou barreiras de difusão.....	29
Figura 3 -	Funções das septinas nos diferentes sistemas e suas conexões com doenças humanas. O diagrama esquemático lista os principais sistemas do corpo humano e mapeia processos e estruturas que requerem septinas. Os códigos de cores indicam o envolvimento funcional intracelular das septinas na organização da actina (rosa), dos microtúbulos (verde) e de membranas celulares (roxo), na fusão de vesículas (azul) e na apoptose (amarelo). As doenças humanas foram relatadas com base em evidências genéticas, histológicas, genômicas e proteômicas que envolvem as septinas nas patologias de diversos órgãos.....	29
Figura 4 -	Domínios estruturais das septinas.	30
Figura 5 -	Classificação das septinas humanas. Baseado na similaridade de sequências, pode-se separar as septinas em quatro grupos (I-IV).	31
Figura 6 -	Estrutura do complexo hexamérico humano. A) Representação da superfície da unidade hexamérica básica da estrutura cristalográfica. B) Desenho esquemático do complexo e suas interfaces.....	32
Figura 7 –	Estrutura de um monômero de septina (centro) interagindo com duas septinas vizinhas através da interface NC à esquerda e interface G à direita. A ligação ao nucleotídeo inclui resíduos pertencentes às duas subunidades adjacentes. A região SUE está representada em roxo contribui para as duas interfaces, porém, é mais notável a contribuição à interface NC, que é única para	

septinas. Em vermelho, verde e azul estão representados os motivos G1, G3 e G4, respectivamente..... 34

Figura 8 - Detalhes das interfaces G e NC. A) Interface G canônica em SmSEPT10 com ligação à GTP. Em azul claro estão representados resíduos que interagem com o GTP da subunidade vizinha. B) Interface NC canônica em SEPT2. 34

Figura 9 - Comparação entre a formação de filamentos de septinas humanas. A) Complexo hexamérico formado por SEPT2, SEPT6 e SEPT7, baseado na estrutura cristalográfica. B) Complexo octamérico incluindo a SEPT9..... 35

Figura 10 – Diagrama esquemático das Regras de Kinoshita para a substituições das septinas no filamento. As Regras definem que cada septina pode ser substituída, dentro de um filamento, por outras septinas que pertencem ao mesmo grupo..... 36

Figura 11 - Representação das diferentes formas de polimerização das septinas. 37

Figura 12 - Microscopia eletrônica de transmissão de septinas de levedura. A) Formação de filamentos na presença de baixa concentração de sal. B) Complexo octamérico em forma de bastão em alta concentração de sal e classe representativa do complexo indicando sua dimensão. C) Classes representativas do complexo utilizando MBP e GFP para a localização da septina Cdc3 e Cdc10 respectivamente. Na lateral direita está mostrado o complexo octamérico com a posição de cada uma das quatro septinas envolvidas, que em levedura são chamadas de Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12..... 38

Figura 13 - Microscopia eletrônica de transmissão de septinas do complexo humano SEPT2/6/7. A) Classes representativas do complexo hexamérico em forma de bastão em alta concentração de sal. B) Micrografia correspondente à amostra do complexo hexamérico em alta concentração de sal. C) Formação de feixes de filamentos em forma de anéis em baixa concentração de sal, barra de 100 nm. D) Classes representativas do complexo evidenciando a localização da SEPT2 fusionada à MBP. Acima a figura mostra a

	posição de cada uma das três septinas no hexâmero baseado numa combinação da estrutura cristalográfica e os resultados da microscopia eletrônica.....	39
Figura 14 -	Microscopia eletrônica de transmissão de septinas do complexo de <i>C.elegans</i> UNC-50/UNC-61. A) Micrografia correspondente à amostra do complexo tetramérico em alta concentração de sal. B) Classes representativas do complexo tetramérico em forma de bastão em alta concentração de sal e localização da septina UNC-61 fusionada à GFP. C) Formação de feixes de filamentos em baixa concentração de sal. Barra de 10nm em A e 250 nm em C. Ao lado direito, a localização das duas septinas no tetrâmero, conclusão tirada dos estudos de microscopia eletrônica.	39
Figura 15 –	Comparação entre os complexos de septinas de diferentes organismos. A primeira imagem representa o complexo humano SEPT2-SEPT6-SEPT7, a segunda, o complexo de levedura e o último, de <i>C.elegans</i>	40
Figura 16 -	Diagrama esquemático simplificado de um microscópio eletrônico de transmissão.....	43
Figura 17 -	Diferença entre micrografias de contrastação negativa e amostras em gelo vítreo. A) Semliki Forest vírus (SFV) em contrastação negativa. B) SFVs em gelo vítreo.....	45
Figura 18 -	Dois exemplos de perfis de CTF no espaço Fourier. A) No foco de Scherzer, há transferência máxima de frequências médias e altas, enquanto que as frequências muito baixas são amortecidas. B) Com alto valor de defoco, a transferência de baixas frequências é melhor, porém há perda de altas frequências.	46
Figura 19 -	Exemplo de análise de partícula única com dados de criomicroscopia eletrônica da hemoglobina de <i>Lumbricus terrestris</i> . A) Micrografia típica utilizada do preparo da amostra em gelo vítreo. B) Partículas selecionadas pelo processo de picking em diferentes orientações. C) Médias de imagens na primeira classificação (MSA) sem alinhamento. D) Médias de imagens após alinhamento (MRA) e ciclos de refinamento de MSA.	48

Figura 20 -	Representação de uma das micrografias do complexo humano SEPT5-SEPT6-SEPT7 utilizada no processamento de imagens, com dimensões 4096 x 4096 pixels e pixel size de 1,78. Barra de escala de 100 nm. Na imagem há a presença de partículas com o tamanho esperado de complexos de septina (em torno de 25 nm) em formato alongado.....	58
Figura 21 -	Representação de algumas partículas sem alinhamento do complexo humano SEPT5-SEPT6-SEPT7. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56 com uma máscara circular.	59
Figura 22 -	Representação de algumas classes sem alinhamento do complexo humano SEPT5-SEPT6-SEPT7. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56. Cada classe possui em média 30 imagens de partículas.....	59
Figura 23 -	Representação de algumas imagens após a nova seleção de partículas. A) Referência utilizada para picking e alinhamento. B) Partículas após alinhamento translacional e rotacional. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.	60
Figura 24 -	Representação de algumas imagens após o novo processo de MSA. A) Classe representativa com escala de 10 nm, evidenciando que o complexo é composto por seis septinas. B) Diferentes Cclasses representativas do complexo humano SEPT5-SEPT6-SEPT7 obtidas após o alinhamento. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56. Pode-se observar pequenas diferenças entre as imagens, como a flexibilidade do complexo.	61
Figura 25 -	Resultados do primeiro MSA do complexo SEPT5(MBP)-SEPT6-SEPT7. A) Classes representativas alinhadas com a mesma referência dos dados anteriores (Figura 17). B) Máscara e primeiras auto-imagens utilizadas no processo de classificação. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.....	62
Figura 26 -	Resultados do segundo MSA do complexo SEPT5(MBP)-SEPT6-SEPT7. A) Máscara utilizada na classificação, com um retângulo centralizado dentro do círculo. B) Classes representativas	

	resultantes desse novo processo de MSA. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.....	63
Figura 27 -	Resultados do terceiro MSA do complexo SEPT5(MBP)-SEPT6-SEPT7. A) Máscara utilizada na classificação, com um retângulo centralizado dentro de um retângulo maior. B) Classes representativas resultantes desse novo processo de MSA. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.....	63
Figura 28 -	Resultados do último MSA do complexo SEPT5(MBP)-SEPT6-SEPT7. A) Máscara utilizada na classificação, com um retângulo centralizado e metade da imagem coberta. B) Classes representativas resultantes desse processo de MSA. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.....	64
Figura 29 -	Primeiras auto-imagens utilizadas no processo de classificação comparando as três diferentes máscaras utilizadas. Informação da MBP é evidenciada na ponta do complexo humano SEPT5SEPT6-SEPT7. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.	65
Figura 30 -	Ensaio de Western Blot do complexo SEPT5-SEPT6-SEPT7 fusionado à MBP com anticorpo anti-SEPT5. A) Em membrana de nitrocelulose com o padrão de massa molecular Precision Plus Protein™ Prestained Standards (BioRad) está indicado do lado esquerdo da imagem em unidades de kDa e a banda correspondente a SEPT5 fusionada à MBP (86 kDa). B) Gel SDS-PAGE da amostra utilizada no Western Blot, mostrando a presença das três septinas SEPT5(MBP), SEPT7, SEPT6 e SEPT7d. Esta última se refere à SEPT7 degradada que pode ser resultado da degradação proteolítica ou terminação prematura.	66
Figura 31 -	SDS-PAGE 12 % do perfil de expressão e purificação por cromatografia de afinidade ao níquel imobilizado do complexo SEPT5-SEPT6-SEPT7. O padrão de massa molecular, em kDa, está indicado à esquerda da imagem. A) Fração insolúvel após lise celular; B) Fração solúvel; C) Fração solúvel após passagem pela resina de afinidade; D) e E) Eluato das etapas de lavagem da coluna com tampão contendo Triton 0,1% mM e 5 mM de imidazol,	

respectivamente; F) Proteínas eluídas com tampão contendo 400 mM de imidazol; G) Eluato da cromatografia de afinidade concentrada, antes da aplicação em coluna de exclusão molecular, indicada ao lado direito as septinas correspondentes. 67

Figura 32 - SDS-PAGE 12 % do perfil de cromatográfico em coluna de exclusão molecular Superdex 200 do complexo SEPT5-SEPT6-SEPT7. O padrão de massa molecular, em kDa, está indicado à esquerda da imagem. A) Eluato da cromatografia de afinidade concentrada, antes da aplicação em coluna de exclusão molecular; B) Fração coletada de 6 a 7 mL; C) Fração coletada de 7 a 8 mL D) Fração coletada de 8 a 9 mL E) Fração coletada de 9 a 10 mL; F) Fração coletada de 10 a 11 mL; G) Mesmo que Fração D representando ao lado direito as septinas correspondentes. 68

Figura 33 - Cromatograma do complexo proteico SEPT5-SEPT6-SEPT7 em coluna de exclusão molecular Superdex 200 com fracionamento de 1 mL. A fração coletada de 8 a 9 mL foi utilizada para a imunomarcação e análise em negative stain. 68

Figura 34 - Representação de uma das micrografias do complexo hexamérico humano SEPT5-SEPT6-SEPT7 marcado com anticorpo anti-sept5 ... 69

Figura 35 - Imagens recortadas das micrografias do complexo hexamérico humano SEPT5-SEPT6-SEPT7 com anti-sept5. A) Imagem representativa do complexo com dois anticorpos. Barra de escala de 30 nm. B) Imagens recortadas de diversas micrografias, demonstrando as diferentes formas de interação do anticorpo. As imagens possuem 300 x 300 pixels. 70

Figura 36 - Diferentes estruturas da interação com anticorpo e complexo de septinas. A) Imagens selecionadas de diferentes estruturas formadas pelo anticorpo e septinas observadas por MET. B) Localização do anticorpo (círculo) e do complexo hexamérico (retângulo) nas imagens de MET. C) Representação esquemática das estruturas observadas, com anticorpos em laranja e complexo hexamérico em cinza. 71

Figura 37 -	Representação de uma das micrografias do complexo de Ciona intestinalis SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 utilizada no processamento de imagens, com dimensões 4096 x 4096 pixels e pixel size de 1,78. Barra de escala de 100 nm.....	72
Figura 38 -	Representação de algumas classes representativas do complexo de Ciona intestinalis após o alinhamento rotacional e primeiro processo de MSA. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.....	73
Figura 39 -	Primeiras auto-imagens utilizadas no processo de classificação. Informação da estrutura circular contaminante é evidenciada no centro da segunda auto-imagem. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.	74
Figura 40 -	Representação de algumas imagens após o novo processo de MSA. A) Classe representativa evidenciando que o complexo é composto por seis septinas. B) Classes representativas do complexo de <i>C. intestinalis</i> . Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.....	74
Figura 41 -	Comparação entre posição das septinas humanas no complexo SEPT5-SEPT6-SEPT7. A) Arranjo proposto com os resultados obtidos neste projeto. B) Arranjo proposto por Sirajuddin <i>et al</i> com a substituição da SEPT2 por SEPT5, seguindo as Regras de Kinoshita.	78
Figura 42 -	Análise da estabilidade das interações PISA e PDBsum para as interfaces NC e G, entre SEPT3-SEPT3 e SEPT2-SEPT6, respectivamente. A) Resultado do programa PISA, onde pode-se observar menor estabilidade da interação na interface NC. B) Resultado do programa PDBsum onde pode-se observar quantidade maior de interações iônicas na interface NC.	80
Figura 43 -	Hipótese do local de ruptura do filamento em caso de solução com alta força iônica para o complexo modelo formado pelas SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT9, baseado na estabilidade do <i>coiled coil</i> das interfaces NC que estão representados por retângulos verticais, evidenciando os diferentes tamanhos dessa estrutura.	81

Figura 44 - Hipótese do local de ruptura do filamento em caso de solução com alta força iônica, baseado na estabilidade do coiled coil das interfaces NC, no caso sem septinas do Grupo I.....	82
Figura 45 - Comparação entre complexo octamérico de septina humano (acima) e de levedura (abaixo).	83
Figura 46 - Hexâmero de levedura é formado na ausência de Cdc10, com interface de septina análoga ao Grupo III exposta.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Construções dos plasmídeos utilizados para a expressão e purificação do complexo SEPT5/6/7.	52
Tabela 2 – Comparação entre os valores de peso molecular das septinas do complexo SEPT5/6/7.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2D	bidimensional
CCD	Dispositivo de carga acoplada, do inglês, Charge-coupled Device
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
CTF	Função de transferência de contraste, Contrast Transfer Function
GDP	Guanosina difosfato
GFP	Proteína verde fluorescente, do inglês, Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosina trifosfato
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LNNano	Laboratório Nacional de Nanotecnologia
MBP	Proteína de ligação à maltose, do inglês, Maltose Binding Protein
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MRA	Alinhamento multi-referência, do inglês, Multireference Alignment
MSA	Análise estatística multivariada, do inglês, Multivariate Statistical Analysis
PDB	Banco de dados de estruturas, do inglês, Protein Data Bank
SDS-PAGE	Eletroforese usando gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes
SEPT	Septina
SUE	Elementos únicos de septinas, do inglês, Septin Unique Element
SFV	Semliki Forest Vírus
tRNA	Ácido ribonucleico transportador

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	Septinas	27
1.1.1	Identificação das septinas.....	27
1.1.2	Diversidade funcional das septinas e doenças	28
1.1.3	Estrutura das septinas	30
1.1.4	Complexo modelo SEPT2, SEPT6 e SEPT7	31
1.1.5	Formação de Filamentos	36
1.1.6	Complexos estudados neste projeto.....	41
1.2	Microscopia eletrônica de transmissão	42
1.2.1	Fundamentos da microscopia eletrônica	42
1.2.2	Análise de partícula única.....	45
2	OBJETIVOS	49
2.1	Objetivo Geral	49
2.2	Objetivos Específicos	49
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1	Plasmídeos e linhagens bacterianas para expressão heteróloga	51
3.2	Transformação bacteriana e co-expressão das SEPT5NGC, SEPT5NGC-MBP, SEPT6NGC e SEPT7-NGC.....	52
3.3	Purificação do complexo SEPT5NGC/SEPT6NGC/SEPT7NGC.....	53
3.4	Purificação do complexo SEPT5NGC-MBP/SEPT6NGC/SEPT7NGC.....	53
3.5	Western Blot.....	54
3.6	Microscopia Eltrônica de Transmissão.....	55
3.7	Processamento de imagens – Análise de Partícula Única	55
4	RESULTADOS	57
4.1	Processamento de imagens do complexo SEPT5-SEPT6-SEPT7	57
4.2	Processamento de imagens do complexo SEPT5(MBP)-SEPT6-SEPT7 .61	

4.3	Imunomarcção do complexo SEPT5-SEP6-SEPT7.....	65
4.4	Processamento de imagens do complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 de <i>Ciona intestinalis</i>	72
5	DISCUSSÃO.....	77
5.1	Complexo humano SEPT5-SEPT6-SEPT7	77
5.2	Complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 de <i>Ciona intestinalis</i>	85
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	87
	REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Septinas

1.1.1 Identificação das septinas

Septinas são proteínas pertencentes à família de GTPases que possuem a capacidade de formar filamentos e estão envolvidas em diversos e importantes processos celulares.

As septinas foram inicialmente descobertas por Hartwell, em 1971, durante varredura por genes que eram críticos no processo de divisão celular em linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* mutantes, sensíveis à temperatura. Foi observado que as mutações encontradas em quatro genes (*cdc3*, *cdc10*, *cdc11* e *cdc12*, do inglês *cell division cycle*), além de prejudicarem a citocinese, também resultavam na formação de células multi-nucleadas.¹ O sequenciamento desses genes mutados revelou uma alta similaridade e, devido à importância dessas proteínas na formação do septo, responsável por separar a célula-mãe da célula-filha, estas foram nomeadas “septinas”.²

Posteriormente, Byers e Goetsch identificaram filamentos de 10 nm em diâmetro formando um anel altamente ordenado presente no septo de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando microscopia eletrônica.³ Além disso, os produtos destes genes foram identificados por imunofluorescência, formando a mesma estrutura filamentosa (Figura 1).⁴

Figura 1 - Localização das septinas no processo de divisão celular em *Saccharomyces cerevisiae*. A) Microscopia eletrônica com escala representando 0.1 μm . B) Imunofluorescência evidenciando a presença das septinas nas etapas do ciclo celular, primeiramente formando um anel que circula o sítio de brotamento nos estágios finais da etapa G1, até a separação entre a célula-mãe da célula-filha.

Fonte: Adaptada de BYERS; GOETSCH;³ GLADFELTER.⁴

Septinas ortólogas foram encontradas em diversos organismos eucariotos, como animais, fungos e algas. Porém, não foi reportada sua presença em plantas.⁵

O número de genes codificantes para septinas varia entre esses organismos, com o mínimo de um no caso da *Chlamydomonas reinhardtii*, ou até 13 em humanos (SEPT1 a SEPT12 e SEPT14). Anteriormente eram descritos 14 genes de septinas humanas, mas recentemente a SEPT13 foi confirmada como um pseudogene. Além disso, há a possibilidade de splicing alternativo, fazendo com o que o número de isoformas seja ainda maior, possivelmente devido à maior diversidade funcional das septinas em humanos.⁶⁻⁷ Além do complexo humano, neste trabalho também estudamos o complexo de *Ciona intestinalis*, um urocordado que possui apenas quatro genes que codificam septinas.⁸

1.1.2 Diversidade funcional das septinas e doenças

Além da citocinese, há diversos outros processos celulares importantes em que as septinas estão envolvidas, atuando como “andaimes” no recrutamento de outras proteínas ou como barreiras de difusão na compartimentalização de proteínas de membrana de domínios celulares específicos (Figura 2).^{4,9-10}

Figura 2 - Funções diversas das septinas, atuando como “andaimes proteicos” ou barreiras de difusão. Fonte: Adaptada de MOSTOWY.⁹

Em paralelo, estudos têm indicado que alterações no nível de expressão das septinas estão relacionadas com diversos tipos de câncer e mutações em alguns aminoácidos também estão relacionados à infertilidade masculina e fenótipos sensíveis à temperatura em leveduras.¹¹⁻¹² No cérebro de pacientes com algumas desordens neurológicas, como Alzheimer e Parkinson, são encontrados agregados de proteínas. As septinas são associadas com essas doenças pois são encontradas nesses agregados proteicos.¹²⁻¹³ Porém, a relação causa e efeito dessas alterações ainda devem ser estabelecidas.

Figura 3 - Funções das septinas nos diferentes sistemas e suas conexões com doenças humanas. O diagrama esquemático lista os principais sistemas do corpo humano e mapeia processos e estruturas que requerem septinas. Os códigos de cores indicam o envolvimento funcional intracelular das septinas na organização da actina (rosa), dos microtúbulos (verde) e de membranas celulares (roxo), na fusão de vesículas (azul) e na apoptose (amarelo). As doenças humanas foram relatadas com base em evidências genéticas, histológicas, genômicas e proteômicas que envolvem as septinas nas patologias de diversos órgãos.

Fonte: Adaptado por MARTINS.¹⁴

1.1.3 Estrutura das septinas

Em relação à estrutura primária, as septinas podem ser divididas em três principais domínios: N-terminal, domínio GTPase e C-terminal (Figura 4).

Figura 4 - Domínios estruturais das septinas.
Fonte: Adaptada de PAN.⁵

A região N-terminal é variável e não possui similaridade entre as septinas, com exceção da região polibásica ou hélice α_0 , rica em resíduos básicos. Estudos sugerem que essa região pode ter uma função regulatória sobre a interação das septinas com membranas celulares.¹⁵⁻¹⁶ Além disso, há evidências experimentais de que a região N-terminal é intrinsecamente desordenada.¹⁷

A região GTPásica é a mais conservada entre as septinas. A capacidade de ligação à GTP é essencial para a interação entre septinas e fundamental para garantir a integridade estrutural, de forma que a ligação à GTP e sua hidrólise controla a montagem dos filamentos, estabilidade das interfaces dos polímeros de septinas e associação com membranas.¹⁸⁻¹⁹

Esse domínio possui apenas três (G1, G3 e G4) dos cinco motivos de ligação à GTP tipicamente encontrados em pequenas GTPases (G1 até G5). A região G1 (também conhecido como *Walker A box*) possui uma sequência consenso GxxxxGKST, que forma o P-loop, responsável pela interação com os grupos fosfato do nucleotídeo. A região G3 contém resíduos hidrofóbicos seguidos por DxxG e é responsável por ligar Mg^{2+} , interagindo com os fosfatos β e γ do GTP. Já o motivo G4 é importante para a especificidade de ligação ao GTP.²⁰⁻²²

Ao final do domínio G encontra-se o SUE (do inglês, *Septin Unique Element*), região de 50 resíduos conservada entre as septinas, que as distingue de outros membros das P-loop GTPases, além de contribuir com a estabilidade dos filamentos.^{20,24-25}

O domínio C-terminal possui sequências preditas para a formação de *coiled-coil*, que possui um papel importante na estabilização das interfaces septina-septina

e talvez influencie no controle da montagem dos filamentos, além disso, pode estar relacionada com a interação com outras proteínas.²⁵⁻²⁶

1.1.4 Complexo modelo SEPT2, SEPT6 e SEPT7

Como citado anteriormente, existem 13 genes que codificam septinas em humanos, além das diferentes isoformas devido a ocorrência de splicing alternativo e modificações pós-traducionais.⁶⁻⁷ Baseado na similaridade da estrutura primária incluindo o tamanho da região em *coiled coil* do domínio C-terminal, é possível dividir as septinas humanas em quatro grupos distintos (I-IV), como representado na Figura 5.

Figura 5 - Classificação das septinas humanas. Baseado na similaridade de sequências, pode-se separar as septinas em quatro grupos (I-IV).
Fonte: MACEDO.²⁵

A região C-terminal das septinas do grupo I é pequena em relação às outras septinas e não possui a região predita *coiled-coil*. Além disso, a maioria das septinas são capazes de hidrolisar GTP para GDP, mas as septinas do grupo II não possuem um resíduo chave em seu domínio GTPásico que coordena essa hidrólise.²⁷

Foi demonstrado também que as septinas humanas e de diversos outros organismos, como *S. cerevisiae*, *C. elegans* e *D. melanogaster* possuem a capacidade de formar complexos hetero-oligoméricos, filamentos e estruturas de mais alta ordem.^{24,27-29}

O complexo de septinas humanas melhor caracterizado é composto pelas septinas 2, 6 e 7, cuja estrutura tridimensional foi resolvida por cristalografia com resolução de 4 Å, representado na Figura 6.²⁷

Figura 6 - Estrutura do complexo hexamérico humano. A) Representação da superfície da unidade hexamérica básica da estrutura cristalográfica. B) Desenho esquemático do complexo e suas interfaces.

Fonte: Adaptada de SIRAJUDDIN;²⁷ KIM.³⁰

Com essa resolução da estrutura cristalográfica, foi possível identificar os domínios que participam das interações entre septinas, podendo ser entre N e C-terminais (interface NC) ou entre domínios G (interface G) que alternam pelo filamento. Porém, não foi detectada densidade para as estruturas *coiled-coil* do C-terminal. Uma interface NC intacta e a presença do domínio SUE são essenciais para a polimerização das septinas e o que as difere de outras GTPases, que não são capazes de se polimerizar e apenas interagem entre si pelo domínio G.¹⁹ O domínio GTPase é suficiente para formar ambas as interfaces, porém, a presença do N e C-terminais contribuem com a afinidade e especificidade das interações.³¹

Esta estrutura teve como unidade assimétrica o trímero de SEPT2-SEPT6-SEPT7 e a aplicação da simetria cristalográfica (eixos de ordem 2 em ambas as extremidades do trímero) leva à formação de um filamento contínuo. Por outro lado, quando examinado por microscopia eletrônica de transmissão na presença de

elevadas concentrações de NaCl (>500mM) estes filamentos não são observados, aparecendo apenas unidades hexaméricas (protofilamentos). A estrutura cristalográfica indica duas possibilidades para os hexâmeros (SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7 ou SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT7-SEPT6-SEPT2). Para distinguir entre as duas e identificar a septina localizada no centro do hexâmero, foi feita uma fusão da SEPT2 com MBP (*Maltose Binding Protein*). Estudos de microscopia eletrônica de hexâmeros incluindo esta versão fusionada da SEPT2 levou os autores a propor que a ordem correta da montagem do complexo é a que está representada na Figura 6, com a SEPT2 no centro do complexo e a SEPT7 na extremidade, com a interface G disponível.

As interações neste complexo entre SEPT2-SEPT2 e SEPT6-SEPT7 são mediadas pela interface NC, enquanto que interações entre SEPT2-SEPT6 e SEPT7-SEPT7 são geradas pela interface G. Apesar da baixa resolução da estrutura ainda foi possível observar densidade para os nucleotídeos ligados em diferentes septinas, indicando que SEPT2 e SEPT7 são ligados à GDP, enquanto a molécula de GTP é observada ligando-se à SEPT6, consistente com o fato da falta de atividade catalítica associada ao grupo da SEPT6.^{19,27}

Além da estrutura do complexo, há dez estruturas depositadas no PDB (*Protein Data Bank*) de domínios GTPase de septinas individuais. Na estrutura da SEPT2 isolada, por exemplo, há a formação de um filamento utilizando ambas as interfaces (G e NC) assim como no heterocomplexo apresentado anteriormente. Porém, em solução foram observados dímeros de SEPT2. Para descobrir qual das duas interfaces eram utilizadas na formação desse dímero, foram feitas mutações na interface NC e, por cromatografia de exclusão molecular analítica, a SEPT2 foi eluída como uma mistura de monômeros e dímeros. Já para as mutações na interface G, houve eluição de apenas monômeros, concluindo que preferencialmente a interação é feita através do domínio G em solução, ao contrário do observado na estrutura hexamérica onde a SEPT2 interage com ela mesma através da interface NC. Este resultado sugere então promiscuidade das interações entre septinas.²⁷

A formação correta das interfaces que levam à montagem do heterofilamento de septinas ainda é pouco compreendida. Alguns estudos demonstram que o *coiled-coil* presente na região C-terminal é importante para a correta formação de filamentos. Em humanos por exemplo, as septinas pertencentes aos grupos das SEPT6 e SEPT7 apresentam um longo domínio C-terminal, com mais de 100

resíduos, enquanto que essa região possui um tamanho intermediário em septinas do grupo da SEPT2 e um ainda menor em septinas do grupo da SEPT3.¹⁹ Foi demonstrado que a interação entre o domínio C-terminal da SEPT6 com SEPT7, formando um coiled-coil heterodimérico é muito mais estável que o coiled-coil homodimérico formado pela SEPT2, provavelmente devido ao tamanho do coiled-coil da SEPT6 e SEPT7 ser maior comparado ao coiled-coil da SEPT2.^{26,31}

As interações entre as interfaces G e NC podem ser melhor observadas na Figura 7 e Figura 8.¹⁹

Figura 7 – Estrutura de um monômero de septina (centro) interagindo com duas septinas vizinhas através da interface NC à esquerda e interface G à direita. A ligação ao nucleotídeo inclui resíduos pertencentes às duas subunidades adjacentes. A região SUE está representada em roxo contribui para as duas interfaces, porém, é mais notável a contribuição à interface NC, que é única para septinas. Em vermelho, verde e azul estão representados os motivos G1, G3 e G4, respectivamente.

Fonte: Adaptada de VALADARES.¹⁹

Figura 8 - Detalhes das interfaces G e NC. A) Interface G canônica em SmSEPT10 com ligação à GTP. Em azul claro estão representados resíduos que interagem com o GTP da subunidade vizinha. B) Interface NC canônica em SEPT2.

Fonte: Adaptada de VALADARES.¹⁹

Na Figura 8 podemos observar os detalhes das interações entre monômeros. Na Figura 8A estão representadas as interações na interface G. Os resíduos que interagem com o GTP ligado à subunidade vizinha (em azul) inclui um resíduo conservado, Glu192, que forma uma ponte salina com Arg253, integrando a ligação ao nucleotídeo. Outras interações com o nucleotídeo ocorrem com resíduos da mesma subunidade (verde) ou da subunidade vizinha (azul). A Figura 8B mostra as interações que ocorrem na interface NC. A característica mais proeminente da interface NC é uma rede de pontes salinas envolvendo resíduos carregados provenientes da hélice $\alpha 6$ e região envolvendo o C-terminal da hélice $\alpha 2$ juntamente com o seguinte loop.¹⁹

Apesar da estrutura do complexo ser hexamérica, estudos recentes mostram que a SEPT9, que pertence ao Grupo I, pode estar localizada em posição terminal e interagir com a SEPT7 no complexo, gerando então um octâmero, assim como observado em septinas de leveduras.^{32–35} Complexos octaméricos podem ser mais relevantes em termos fisiológicos.¹⁹ Na Figura 9 está representada uma comparação com a possível formação do complexo humano incluindo a SEPT9 e suas interações, arranjo proposto primeiramente por Nakahira *et al.*³⁵

Figura 9 - Comparação entre a formação de filamentos de septinas humanas. A) Complexo hexamérico formado por SEPT2, SEPT6 e SEPT7, baseado na estrutura cristalográfica. B) Complexo octamérico incluindo a SEPT9.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com base nesse modelo e a divisão das septinas nos quatro grupos citados, temos a chamada “Regra de Kinoshita”, fundamentado pelos estudos de Kinoshita³⁶ com a qual podemos prever a composição de septinas no filamento. A regra diz que cada septina particular pode ser substituída por outra que pertence ao mesmo

grupo e ainda formar um filamento viável, o que pode gerar 60 combinações diferentes de quatro septinas, sendo uma representante de cada grupo, como está representado na Figura 10. Porém, a generalização da hipótese de Kinoshita ainda não é totalmente estabelecida visto que a expressão das septinas nos diferentes tecidos é fisiologicamente menor do que o número combinações teórico possível e, além disso, foram relatados arranjos não canônicos na literatura.^{9,19,37}

Figura 10 – Diagrama esquemático das Regras de Kinoshita para a substituições das septinas no filamento. As Regras definem que cada septina pode ser substituída, dentro de um filamento, por outras septinas que pertencem ao mesmo grupo.

Fonte: Elaborada pela autora.

1.1.5 Formação de Filamentos

As septinas possuem a capacidade de se polimerizar em complexos homo e hetero-oligoméricos que podem se unir e formar filamentos, que por sua vez podem interagir lateralmente formando feixes de filamentos e estruturas de mais alta ordem, como representado na Figura 11.

Figura 11 - Representação das diferentes formas de polimerização das septinas.
Fonte: MOSTOWY.⁹

A concentração de sal influencia na formação dessas estruturas. Foi relatado que em altas concentrações de sal os oligômeros de septinas prevalecem, enquanto que em baixas concentrações de sal a polimerização é favorecida. Isso supostamente ocorre porque a interface G da SEPT7 no complexo modelo hexamérico humano (SEPT2/6/7) proposto por Sirajuddin *et al.*, que é utilizada na polimerização, deve ser sensível à alta concentração salina.

Estudos utilizando microscopia eletrônica de transmissão com análise de partícula única de diferentes complexos oriundos de várias espécies mostram que os complexos oligoméricos possuem a forma de um bastão linear e em alguns casos foi possível localizar septinas específicas utilizando uma proteína de fusão como a MBP ou GFP e/ou a interação com anticorpos específicos (Figuras 12-14).^{25-28,38-39}

Nos três exemplos apresentados, o tamanho do oligômero (protofilamento) varia, sendo um octâmero (baseado em quatro septinas diferentes) em levedura, um hexâmero (baseado em três) em humanos e um tetrâmero (baseado em duas) em *C. elegans*.

Figura 12 - Microscopia eletrônica de transmissão de septinas de levedura. A) Formação de filamentos na presença de baixa concentração de sal. B) Complexo octamérico em forma de bastão em alta concentração de sal e classe representativa do complexo indicando sua dimensão. C) Classes representativas do complexo utilizando MBP e GFP para a localização da septina Cdc3 e Cdc10 respectivamente. Na lateral direita está mostrado o complexo octamérico com a posição de cada uma das quatro septinas envolvidas, que em levedura são chamadas de Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12.

Fonte: Adaptada de BERTIN;³⁷ FRAZIER.²⁹

Figura 13 - Microscopia eletrônica de transmissão de septinas do complexo humano SEPT2/6/7. A) Classes representativas do complexo hexamérico em forma de bastão em alta concentração de sal. B) Micrografia correspondente à amostra do complexo hexamérico em alta concentração de sal. C) Formação de feixes de filamentos em forma de anéis em baixa concentração de sal, barra de 100 nm. D) Classes representativas do complexo evidenciando a localização da SEPT2 fusionada à MBP. Acima a figura mostra a posição de cada uma das três septinas no hexâmero baseado numa combinação da estrutura cristalográfica e os resultados da microscopia eletrônica.

Fonte: Adaptada de KINOSHITA,³⁹ SIRAJUDDIN.²⁷

Figura 14 - Microscopia eletrônica de transmissão de septinas do complexo de *C. elegans* UNC-50/UNC-61. A) Micrografia correspondente à amostra do complexo tetramérico em alta concentração de sal. B) Classes representativas do complexo tetramérico em forma de bastão em alta concentração de sal e localização da septina UNC-61 fusionada à GFP. C) Formação de feixes de filamentos em baixa concentração de sal. Barra de 10nm em A e 250 nm em C. Ao lado direito, a localização das duas septinas no tetrâmero, conclusão tirada dos estudos de microscopia eletrônica.

Fonte: Adaptada de JOHN.²⁴

Diferente da estrutura de filamentos de actina e microtúbulo, em todas as micrografias (Figuras 12-14) podemos notar a não-polaridade dos filamentos de septina.⁹

A Figura 15 resume de forma esquemática os três complexos mostrados anteriormente. Pode-se observar que as interfaces se alternam na formação dos heterocomplexos, porém a interface exposta devido à alta concentração de sal não é a mesma nos três casos. Em humanos, como dito anteriormente, a interface exposta e, portanto, sensível à concentração de sal, é a interface G da SEPT7. Porém, no caso do complexo de *S. cerevisiae* a interface sensível à sal é a NC da septina cdc11, enquanto que no complexo de *C. elegans* a interface G está exposta. Portanto ainda não há uma hipótese sobre como a concentração salina interfere na polimerização.

Figura 15 – Comparação entre os complexos de septinas de diferentes organismos. A primeira imagem representa o complexo humano SEPT2-SEPT6-SEPT7, a segunda, o complexo de levedura e o último, de *C. elegans*.

Fonte: Adaptada de WEIRICH.⁴⁰

O ponto crítico do estudo com septinas é a falta de uma estrutura em alta resolução de um heterofilamento, de qualquer espécie. A flexibilidade da estrutura pode ser o motivo principal das tentativas de cristalização falharem. Essa dificuldade é agravada também devido à baixa solubilidade das septinas individuais completas, ou seja, contendo todos os seus domínios, sendo propensas à precipitação, mesmo quando mantidas em solução tampão com alta concentração de sal e glicerol. Além disso, muitas amostras de septinas não podem ser congeladas e raramente são estáveis o suficiente para serem viáveis em algumas horas mantidas em gelo.¹⁹⁻²³

Nesse sentido, os avanços em crio-microscopia eletrônica com análise de partícula única podem representar uma possível solução, visto que têm sido reportadas estruturas com cada vez mais altas resoluções e de moléculas cada vez menores. A técnica tem potencial de não só elucidar informações tridimensionais, como também variações devido às mudanças conformacionais possíveis.^{19,41}

1.1.6 Complexos estudados neste projeto

O objeto de estudo principal deste trabalho foi o complexo humano SEPT5-SEPT6-SEPT7. Devido à similaridade de sequência entre as septinas que pertencem ao mesmo grupo, espera-se que este conjunto de septinas seja capaz de formar um hexâmero similar ao complexo humano SEPT2-SEPT6-SEPT7 com a SEPT5 substituindo a SEPT2 nesta montagem, localizando-se então ao centro, conforme a regra de Kinoshita. Esse sistema também foi escolhido devido à metodologia de purificação já bem estabelecida no laboratório, possuindo em sua composição septinas contendo todos os seus domínios. Porém, nenhum estudo, até o momento, comprovou o arranjo desse complexo.

Estudos utilizando microscopia eletrônica de transmissão revelaram que a SEPT5, assim como a SEPT4 e SEPT8, cercam os grânulos alfa, que contém fibrinogênio e fator de crescimento plaquetário, sugerindo que eles podem ser componentes do mesmo complexo em plaquetas com um possível papel funcional no transporte e secreção granular plaquetário.^{42,45}

Plaquetas de ratos deficientes em SEPT5 apresentaram uma alteração na liberação de grânulos e revelaram um limiar reduzido para a agregação plaquetária, sugerindo que o SEPT5 está envolvido na fisiologia das plaquetas.⁴³⁻⁴⁴

Além disso, a SEPT5 mostrou ser colocalizada com a SEPT6 na periferia das plaquetas e no citoplasma e foi também associada à microtúbulos de plaquetas no complexo SEPT5-6-7, promovendo um papel importante das septinas no tráfego de grânulos através da sua associação com a rede de microtúbulos. O mesmo estudo revelou ainda que SEPT9 faz parte do complexo SEPT5-6-7-9 em plaquetas.⁴⁴⁻⁴⁵ O complexo SEPT5-6-7 também foi sugerido por ensaios de duplo híbrido em outro estudo.³³

Outro complexo estudado neste trabalho é composto por septinas de *Ciona intestinalis*, um urocordado que possui genes para quatro septinas homólogas. Cada uma delas possui maior similaridade de sequência com um grupo diferente de septinas entre os quatro já descritos em humanos. A presença de um representante de cada grupo nesse organismo sugere que os grupos tenham emergido antes da separação entre vertebrados e invertebrados e que o aumento no número de genes que codificam septinas em vertebrados deve ser resultado da duplicação gênica.^{8,19} Uma vez que este organismo apresenta uma septina pertencente a cada grupo, é possível que estas proteínas possam interagir entre si, formando um heterocomplexo similar ao observado em outros organismos, como os complexos humanos. Além dos aspectos evolutivos, esse complexo foi escolhido por ser estudado por um projeto paralelo no laboratório, com metodologia de purificação também já estabelecida.

1.2 Microscopia eletrônica de transmissão

1.2.1 Fundamentos da microscopia eletrônica

Na prática microscópios eletrônicos convencionais podem alcançar resolução de 2Å, enquanto que microscópios de luz visível não ultrapassam 0.5 µm. A interação dos elétrons com o objeto é a base da formação de imagem na microscopia eletrônica. Devido à dualidade onda-partícula, um feixe de elétrons pode se comportar como uma onda. A vantagem de obter imagens com elétrons ao invés de luz visível é devido ao comprimento de onda de *de Broglie* de elétrons de alta energia ser muito menor comparado à luz visível.⁴⁶⁻⁴⁷

Na microscopia eletrônica de transmissão (MET, Figura 16), um feixe de elétrons é emitido por uma fonte de alta voltagem e focalizado na amostra através de bobinas que atuam como lentes para o feixe. Devido a interação do feixe com a amostra, que deve ter uma espessura fina o suficiente para não perturbar a intensidade da função de onda, uma imagem de projeção ampliada do objeto é gerada. A observação dessas imagens é feita por uma tela fluorescente, uma câmera CCD ou por modernos detectores diretos de elétron e podem ser gravadas em filmes fotográficos ou digitalizadas.⁴⁷⁻⁴⁹

Figura 16 - Diagrama esquemático simplificado de um microscópio eletrônico de transmissão.
Fonte: Adaptada de FRANK.⁴⁶

Microscópios modernos podem alcançar níveis de resolução de aproximadamente 1.5 Å, que é considerada uma excelente resolução em cristalografia de raio-X, por exemplo, sendo suficiente para elucidar cadeias de polipeptídeos e determinar posições atômicas com boa precisão. O desafio fundamental para amostras biológicas em MET não é muito o limite de resolução do instrumento, mas sim, a sensibilidade à radiação do material a ser analisado. A informação importante sobre a amostra é proveniente do espalhamento elástico causado pela interação com o elétron, através do contraste de fase gerado. Entretanto, muitos elétrons vão danificar a amostra devido à interação inelástica.⁵⁰

Com o objetivo de melhorar a proteção das amostras, deve haver um cuidado especial no preparo das mesmas. Um dos métodos utilizados é o preparo por contração negativa (*negative stain*), que consiste na cobertura da amostra por uma solução que contém sais de metal pesado, como o acetato de uranila, providenciando uma proteção maior aos possíveis danos da amostra e imagens de alto contraste, mas com algumas desvantagens. Uma delas é a distorção da forma das partículas e danos aos detalhes das mesmas.⁴⁶⁻⁴⁷

Além disso a imagem obtida contém apenas informação de baixa resolução, devido ao tamanho dos cristais salinos da solução de metal pesado que envolve as partículas. Apesar desses aspectos, o método é simples de realizar e muito útil para projetos em que a alta resolução não é necessária, e para testes iniciais sobre a qualidade da amostra e parâmetros de imagem em experimentos mais complexos.⁴⁶

A chamada crio-microscopia eletrônica é um outro método de preparo de amostras que proporciona uma qualidade melhor da informação estrutural de amostras biológicas, previne a evaporação da água da amostra devido ao alto vácuo presente no microscópio e mantém a forma das partículas intacta. O método consiste em congelar rapidamente as amostras em etano líquido, de forma rápida o suficiente para formar gelo vítreo ao invés de gelo cristalino. Apesar da técnica permitir um aumento da exposição da dose aplicada, para imagens de alta resolução, a máxima dose de exposição tolerada é de 5-10 elétrons/Å² e essa dose ainda gera muito ruído nas imagens (Figura 17).⁴⁶⁻⁵⁰

Para superar este problema inerente da microscopia eletrônica, é necessária a obtenção de uma grande quantidade de imagens sobre condições de baixa dose e então aplicar alguma forma de média dessas imagens para melhorar a relação sinal-ruído.⁵⁰

Figura 17 - Diferença entre micrografias de contrastação negativa e amostras em gelo vítreo. A) Semliki Forest vírus (SFV) em contrastação negativa. B) SFVs em gelo vítreo.
 Fonte: SÖDERLUND; VON BONSDORFF; ULMANEN;⁵¹ ADRIAN.⁵²

1.2.2 Análise de partícula única

O processamento de imagem por análise de partícula única tem como objetivo melhorar a relação sinal-ruído das imagens 2D obtidas, além de gerar um modelo tridimensional a partir das mesmas.

Um aspecto importante na formação de imagem em microscopia eletrônica, que deve ser considerado no processamento, é a distorção gerada pela modulação da função de transferência de contraste (CTF: contrast transfer function). Essa característica inerente ao instrumento afeta a amplitude dos coeficientes de Fourier em todas as frequências espaciais das contribuições dos elétrons na projeção do objeto. Essa distorção depende dos parâmetros do microscópio eletrônico, como a

aceleração dos elétrons, aberração das lentes e, crucialmente, o deslocamento em relação ao plano focal na hora da obtenção da imagem.⁵³

Esse deslocamento, também chamado defoco, é importante para a visualização da informação de baixa frequência (contornos e informação de baixa resolução), facilitando a localização das partículas nas micrografias. Dessa forma, mesmo que as informações de alta frequência estejam presentes nas imagens tiradas perto do foco (Scherzer focus), as partículas ruidosas não são mais discerníveis do ruído de fundo devido à falta de informações de baixa frequência e, portanto, elas não podem ser visualizadas. Em altos valores de defoco o CTF oscila muitas vezes no domínio de altas frequências. Essa oscilação precisa ser corrigida computacionalmente após a obtenção das micrografias, visto que há interferência destrutiva ao somar imagens com valores opostos de contraste, de forma que seja recuperada a informação de alta resolução.⁵⁰

Figura 18 - Dois exemplos de perfis de CTF no espaço Fourier. A) No foco de Scherzer, há transferência máxima de frequências médias e altas, enquanto que as frequências muito baixas são amortecidas. B) Com alto valor de defoco, a transferência de baixas frequências é melhor, porém há perda de altas frequências.

Fonte: Adaptada de RIGHETTO.^{47,50}

A presença de zeros no CTF significa que há lacunas no espectro de saída que não contribui com o sinal, como se essas frequências fossem filtradas. A melhor função de transferência é a aquela com menor número de zeros, o que seria o caso para lentes perfeitas, por exemplo.⁵⁴

Como a transferência de contraste não é perfeita, devido à perda ou inversão de algumas frequências espaciais, nessa primeira etapa é necessária a correção das imagens. As imagens são também filtradas e normalizadas para que se tenha um conjunto homogêneo.⁴⁸

Após estas correções, é realizada a seleção de partículas nas micrografias, processo chamado picking, que transforma as partículas reconhecidas nas micrografias em imagens individuais. Esse processo pode ser feito manualmente, porém, para que seja possível alcançar altas resoluções, é necessário um grande número de imagens, obtido mais facilmente por processos automatizados.^{47,50}

Geralmente alguns artefatos são provenientes do picking automatizado, como bordas de carbono na grade, contaminações, fragmentos de moléculas e etc. Estas imagens são excluídas com base nos seus valores de desvio padrão e alguns critérios de seleção podem ser utilizados, como densidade média, sigma e coeficiente de correlação cruzada.⁵⁵

As imagens obtidas possuem uma relação sinal-ruído muito baixa, portanto é necessário realizar uma soma das imagens semelhantes. Mas para que isso seja possível, as imagens devem passar por um processo de alinhamento translacional e rotacional para correlação.⁴⁸ Ao alinhar um conjunto de imagens em relação a uma referência através de processos de correlação é possível introduzir propriedades da referência utilizada no conjunto de dados, essas tendências que podem ser inseridas são chamadas bias.⁵⁰

Para que isso seja evitado, o alinhamento inicial deve ser feito sem referências externas ao conjunto de dados, como o alinhamento por classificação, onde as imagens são inicialmente centralizadas com relação à soma total do conjunto de dados e uma classificação por análise estatística multivariada (MSA – *Multivariate Statistical Analysis*) é utilizada para dividir em grupos as imagens similares, identificando projeções características das moléculas. Neste processo de classificação as imagens do conjunto de dados podem ser consideradas como combinação linear das chamadas auto-imagens (*eigen-images*), utilizadas para

dividir as imagens originais similares em grupos. As imagens pertencentes ao mesmo grupo após a classificação são somadas e utilizadas como referência para um alinhamento multi-referência (MRA – *Multireference Alignment*).⁴⁸⁻⁵⁶⁻⁵⁷

Um exemplo de como o alinhamento pode melhorar a resolução das médias das imagens está representado na Figura 19.

Figura 19 - Exemplo de análise de partícula única com dados de crio-microscopia eletrônica da hemoglobina de *Lumbricus terrestris*. A) Micrografia típica utilizada do preparo da amostra em gelo vítreo. B) Partículas selecionadas pelo processo de picking em diferentes orientações. C) Médias de imagens na primeira classificação (MSA) sem alinhamento. D) Médias de imagens após alinhamento (MRA) e ciclos de refinamento de MSA.

Fonte: Adaptada de AFANASYEV.⁵⁵

As classes são refinadas após ciclos de MSA-MRA, ao melhorar a relação sinal-ruído dos dados originais. A partir de boas classes com projeções representativas das moléculas, é possível fazer uma reconstituição angular, onde são determinados os ângulos de Euler que definem a orientação de cada projeção, e um modelo tridimensional pode então ser obtido.^{48,50}

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi utilizar a microscopia eletrônica de transmissão e análise de partícula única para estudar heterocomplexos de septinas para compreender melhor seu processo de auto-montagem.

2.2 Objetivos Específicos

Fundamentado no objetivo geral, o estudo baseou-se no complexo humano SEPT5-SEPT6-SEPT7 e foram indicados os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Co-expressar e co-purificar o complexo humano SEPT5-SEPT6-SEPT7 com e sem imunomarcacão com anti-sept5.
- ✓ Analisar e coletar imagens do complexo humano SEPT5-SEPT6-SEPT7 com e sem imunomarcacão no microscópio eletrônico de transmissão.
- ✓ Processar as imagens coletadas por análise de partícula única do complexo humano SEPT5-SEPT6-SEPT7 com e sem fusão da SEPT5 com MBP.
- ✓ Determinar a posicão de cada componente no complexo obtido e correlacionar os dados com os já existentes na literatura para outras combinações de septinas humanas.
- ✓ Relacionar os resultados com o processo de automontagem do filamento.
- ✓ Analisar e coletar imagens do complexo de *C. intestinalis* SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9.
- ✓ Processar as imagens coletadas por análise de partícula única do complexo de *C. intestinalis* SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Plasmídeos e linhagens bacterianas para expressão heteróloga

A linhagem bacteriana Rosetta DE3 de *E. coli* (Novagen) foi utilizada para co-expressão das septinas humanas SEPT5, SEPT6 e SEPT7. Devido à presença de um plasmídeo extra, pRARE, que apresenta tRNAs para códons raros em *E. coli*, a expressão de proteínas de eucariotos pode aumentar. Além disso, o mesmo plasmídeo confere resistência ao antibiótico cloranfenicol, utilizado como marcador de seleção para as células transformantes.

Os plasmídeos utilizados para a transformação em *E. coli* Rosetta DE3 foram construídos e cedidos pela Dra. Joci Neuby A. Macedo.

Parte do projeto foi desenvolvido a partir de imagens de microscopia coletadas durante o projeto de pós-doutorado da Dra. Joci Neuby A. Macedo, contendo o complexo de SEPT5/6/7. Nestas amostras, a SEPT5 é fusionada à MBP (maltose binding protein), com o objetivo de purificar o complexo de forma equimolar, além de localizar a SEPT5 no complexo por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Outra parte do projeto foi desenvolvido purificando novamente o complexo com a fusão com MBP para confirmar que o anticorpo era específico para SEPT5, através de um Western Blot e uma nova purificação sem a fusão com MBP para a confirmação da localização da SEPT5 por ligação com anticorpo.

A SEPT7 é fusionada à uma tag de histidina em sua região N-terminal, a partir do plasmídeo pETDuet, que também confere resistência à ampicilina. Já as SEPT5 e SEPT6 foram clonadas em vetor pRSFDuet, que confere resistência à cloranfenicol. Os plasmídeos envolvidos nesse projeto estão resumidos na Tabela 1 e seus pesos moleculares, na Tabela 2.

Tabela 1 – Construções dos plasmídeos utilizados para a expressão e purificação do complexo SEPT5/6/7.

	Plasmídeo	Código NCBI
SEPT5NGC-MBP+ SEPT6NGC	pMBPDuet	NM_002688 NM_145799.3
SEPT5NGC+SEPT6NGC	pRSFDuet	NM_002688 NM_145799.3
SEPT7NGC+His-tag	pETDuet	NM_001788.4

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 – Comparação entre os valores de peso molecular das septinas do complexo SEPT5/6/7.

	Peso Molecular (Da)
SEPT5NGC	43462,6
SEPT5NGC-MBP	86224,9
SEPT6NGC	49803,7
SEPT7NGC	50370,5

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 Transformação bacteriana e co-expressão das SEPT5NGC, SEPT5NGC-MBP, SEPT6NGC e SEPT7-NGC

Inicialmente foi feita a transformação das células *E. coli* Rosetta DE3 (Novagem) com 100 ug de cada plasmídeo para 200 ug de células através de choque térmico. As células em que ocorreu a inserção dos plasmídeos são selecionadas devido à presença dos antibióticos aos quais são resistentes.

Foi preparado 25 mL de pré-inóculo, a partir de uma colônia isolada de *E. coli* proveniente da transformação, contendo meio LB com os mesmos antibióticos de seleção. O pré-inóculo foi incubado por 14 horas a 37 °C e agitação de 250 rpm. O inóculo foi então transferido para 1L de meio LB contendo os mesmos antibióticos de seleção, a 37 °C, sob agitação de 250 rpm, até atingir DO_{600nm} entre 0.5-0.8. A partir deste valor, a expressão foi induzida com 0,25 mM de IPTG, com incubação a 20°C e agitação 250 rpm por 18 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 6000 x g por 30 min, a 4°C e a suspensão celular foi armazenada a -80 °C até a realização da purificação.

3.3 Purificação do complexo SEPT5NGC/SEPT6NGC/SEPT7NGC

As células correspondentes à 1L de cultura foram descongeladas e ressuspensas em 30 mL de tampão A (25 mM Tris pH 7.8, 500 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM β -mercaptoetanol, 5% glicerol) e adicionou-se um comprimido de coquetel inibidor de protease (Sigma Aldrich). As células foram rompidas por ultrassonicação e as frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação a 17000 x g, por 30 min a 4 °C. A fração solúvel, que contém o complexo em solução, foi aplicada em coluna de cromatografia contendo 2 mL de Ni-NTA super flow (Qiagen), previamente equilibrada com 10 volumes de tampão A. Posteriormente a resina passou por duas lavagens, a primeira com 10 volumes de tampão A com 0,1% de Triton X-100 e a segunda com 10 volumes de tampão A e 5 mM de imidazol, com o intuito de retirar possíveis contaminantes. O complexo foi então eluído com 10 volumes de tampão A com 400 mM de imidazol.

A segunda etapa da purificação consistiu em uma cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão A. A amostra foi concentrada para volume final de 1 mL, centrifugadas a 14000 rpm, por 10 min a 4°C e então aplicadas na coluna, com fluxo de 0,5 mL e volume das frações coletadas de 1 mL. As amostras finais foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80 °C. A integridade das amostras foi analisada por gel SDS-PAGE 12%.

3.4 Purificação do complexo SEPT5NGC-MBP/SEPT6NGC/SEPT7NGC

A purificação do complexo contendo a fusão com a MBP seguiu inicialmente o mesmo protocolo da purificação do complexo sem MBP (item 3.3). Porém, uma segunda etapa de purificação por afinidade foi realizada com 2,5 mL de resina de amilose (NEB), pré-equilibrada com tampão A. O eluato da primeira cromatografia, realizada com a resina de níquel, foi aplicada duas vezes na resina de amilose, seguido de uma etapa de lavagem com 25 mL de tampão A e eluição com 50 mL de tampão A com 15 mM maltose.

A última etapa da purificação consistiu em uma cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) previamente

equilibrada com tampão A, assim como na purificação do complexo sem MBP. A amostra foi concentrada para volume final de 1 mL, centrifugadas a 14000 rpm, por 10 min a 4°C e então aplicadas na coluna, com fluxo de 0,5 mL e volume das frações coletadas de 1 mL. As amostras finais foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80 °C. A integridade das amostras foi analisada por gel SDS-PAGE 12%.

3.5 Western Blot

Com o intuito de confirmar a posição da SEPT5 no complexo hexamérico com ensaios de imunolocalização em microscopia eletrônica de transmissão, testamos previamente o anticorpo utilizado por Western Blot, a fim de verificar se a interação é específica para SEPT5. Como o peso molecular das septinas do complexo estudado tem valores próximos e difíceis de distinguir no gel de SDS-PAGE, foi utilizada a amostra que continha a SEPT5 fusionada à MBP, pois o peso molecular se tornava o dobro das outras septinas.

Para isso, foi realizada a transferência das bandas proteicas do gel SDS-PAGE para uma membrana de celulose, previamente incubando-se o gel por 1 hora no tampão de transferência (25 mM de Tris, 20 mM de glicina, 0,02 % (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 20 % de metanol), os filtros e a membrana de nitrocelulose por 10 minutos no mesmo tampão. O gel, a membrana e os papéis de filtro foram montados, na ordem de baixo para cima: papel filtro - membrana - gel - papel filtro, na cuba semi-seca BioRad para transferência e mantidos a 15 V por 60 minutos.

A membrana foi então incubada em 20 mL de solução TBS-T (100 mM de Tris, pH 7,6, 150 mM de NaCl e 0,1 % (v/v) de Tween 20) acrescido de 5 % (p/v) de leite em pó desnatado (Molico), por 16 horas, sob agitação constante, a 4 °C. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS-T quatro vezes por 5 minutos, e incubada por duas horas com 15 mL da solução TBS-T, leite em pó 5% e anticorpo primário, *Septin 5/Cdcrel-1 monoclonal antibody* [SP18] (Enzo Life Sciences), com diluição v/v de 1:1000. Novamente, a membrana foi lavada quatro vezes por 5 minutos com TBS-T e então incubada por uma hora com 15 mL de solução TBS-T, leite em pó 5 % e anticorpo secundário, anti-rabbit IgG (Sigma), com diluição v/v 1:5000. Seguiu-se,

então, mais quatro lavagens de cinco minutos com TBS-T. Foi feita a revelação da membrana por fosfatase alcalina (BioRad) por 10 minutos, seguindo protocolo do kit (800 μ L de Tampão 25x, 200 μ L de Reagente A, 200 μ L de Reagente B e H₂O q.s.p. 20 mL).

3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Complexos proteicos de 0,5 a 1,0 mg/mL em tampão A contendo 500 mM de NaCl foram diluídos no mesmo tampão para concentrações de 0,02 a 0,05 mg/mL. A superfície de grades de cobre cobertas por um filme de carbono Ultrathin (PELCO) foram carregadas negativamente com easiGlow™ Glow Discharge Cleaning System (PELCO) para melhor interação da amostra com o carbono. Foram depositados 3 μ L de amostra proteica durante 1 min seguido por uma lavagem com 3 μ L de água. Em seguida a grade é coberta por 3 μ L de acetato de uranila 2%, uma a duas vezes, proporcionando o contraste da amostra. O excesso de cada solução aplicada foi retirado com papel filtro. Os microscópios JEOL-JEM 2100 (200 kV), JEOL-1400 Plus Tungsten (120 kV) e FEI-Talos F200C TEM (200 kV) foram utilizados para análise da qualidade da amostra, condições de preparo da grade e coleta de dados, de 40000 a 60000 x de magnificação. Os experimentos foram realizados no LNNano-CNPq, Campinas com colaboração do Dr. Rodrigo Villares Portugal e Dr. Alexandre Cassago.

3.7 Processamento de imagens – Análise de Partícula Única

Todo o processamento dos dados coletados foi realizado com o software IMAGIC-V (Image Science Software GmbH, Alemanha).⁵⁰⁻⁵⁸ As partículas foram selecionadas inicialmente por modulação, onde é necessário informar os valores aproximados das dimensões das partículas e o segundo processo foi realizado utilizando uma referência, geralmente uma classe (média de imagens de partículas) obtida pelos próprios dados, com uma metodologia baseado no cálculo da correlação cruzada da mesma e a imagem completa das micrografias, identificando a posição de outras partículas.

As dimensões das partículas foram alteradas para dimensões de 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56 Å com o objetivo de diminuir o esforço computacional dos processos posteriores. A classificação das partículas é feita por análise estatística multivariada (MSA – Multivariate Statistical Analysis) para identificar as diferentes projeções da partícula. As projeções são obtidas somando-se as imagens que pertencem à mesma classe, melhorando a relação sinal-ruído e obtendo imagens referentes a cada diferente orientação da partícula. As estratégias de processamento de cada conjunto de dados foram discutidas separadamente na parte de Resultados.

4 RESULTADOS

4.1 Processamento de imagens do complexo SEPT5-SEPT6-SEPT7

A primeira parte deste trabalho se baseia no processamento de dados das imagens de microscopia eletrônica de transmissão obtidas durante o projeto de pós-doutorado da Dra. Joci Neuby Alves Macedo. As grades foram montadas com os complexos em tampão a 800 mM NaCl, pois foi observado na literatura que a interface G das septinas 7 do complexo modelo SEPT2-SEPT6-SEPT7 humano são sensíveis à altas concentrações de sal, impedindo a polimerização para formação de filamentos.²⁷ Dessa forma, é possível observar complexos hexaméricos isolados.

Foram coletadas 500 imagens do complexo com dimensões 4096 x 4096 pixels e pixel size 1,78 Å. Uma das micrografias está representada na Figura 20, onde pode-se observar a presença dos complexos, sem muita contaminação de outras proteínas (com formatos e tamanhos diferentes).

Figura 20 - Representação de uma das micrografias do complexo humano SEPT5-SEPT6-SEPT7 utilizada no processamento de imagens, com dimensões 4096 x 4096 pixels e pixel size de 1,78. Barra de escala de 100 nm. Na imagem há a presença de partículas com o tamanho esperado de complexos de septina (em torno de 25 nm) em formato alongado.

Fonte: Elaborada pela autora.

As imagens passaram por um processo chamado *coarse*, onde o tamanho do pixel foi aumentado por um fator 2, assim dois pixels são transformados em um, de forma que a resolução da imagem seja menor para que o custo computacional do processamento diminuísse. No processo de picking, foram obtidas 57582 imagens de 160 x 160 pixels na seleção de partículas para o conjunto de dados contendo o complexo. As partículas do complexo sem alinhamento estão representadas na Figura 21 e possuem aproximadamente à dimensão de 274 Å de comprimento e 60 Å de largura.

Figura 21 - Representação de algumas partículas sem alinhamento do complexo humano SEPT5-SEPT6-SEPT7. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56 com uma máscara circular.
Fonte: Elaborada pela autora.

Foi realizado um primeiro ciclo de MSA sem nenhum alinhamento com intuito de classificar e separar as imagens obtidas em classes, que são somas de imagens similares. As classes possuem em média 30 imagens em que, além de melhor o sinal ruído das partículas, podemos separar imagens que não são partículas, como contaminantes, proteínas agregadas e parte do carbono da grade que são selecionados também no processo de picking. O não alinhamento das partículas faz com que a classificação das mesmas seja feita pelas formas mais evidentes, as informações de baixa frequência, como a orientação dos complexos, por exemplo. As classes sem alinhamento estão representadas na Figura 22.

Figura 22 - Representação de algumas classes sem alinhamento do complexo humano SEPT5-SEPT6-SEPT7. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56. Cada classe possui em média 30 imagens de partículas.
Fonte: Elaborada pela autora.

Uma dessas classes foi tratada por um processo chamado *smear*, para que ficasse com um aspecto borrado e sem detalhes, para que apenas o tamanho influenciasse. Assim, foi utilizada como referência para um novo picking por correlação cruzada para que fossem selecionadas imagens de partículas de forma mais específica, com posterior alinhamento rotacional e translacional das imagens, para que ficassem todas na mesma posição e a comparação entre elas fosse mais

detalhada. A referência criada e as partículas alinhadas estão representadas pela Figura 23.

Figura 23 - Representação de algumas imagens após a nova seleção de partículas. A) Referência utilizada para picking e alinhamento. B) Partículas após alinhamento translacional e rotacional. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.

Fonte: Elaborada pela autora.

Um novo MSA foi realizado, utilizando uma máscara circular, com aproximadamente 20 imagens por classe, de um conjunto de aproximadamente 18000 imagens de partículas, obtendo-se classes alinhadas mais definidas. Com essas classes foi possível medir com mais precisão o tamanho do complexo, 25 nm de comprimento e 5 nm de largura, compatível com o complexo hexamérico de septinas humanas SEPT2-SEPT6-SEPT7 resolvido por cristalografia e observado por microscopia eletrônica de transmissão por Sirajuddin *et al* (representado na Figura 13).²⁷ Além do tamanho, é possível observar que o complexo é composto por seis septinas que se organizam em forma de bastão com uma certa flexibilidade de curvatura. As novas classes estão representadas na Figura 24.

Figura 24 - Representação de algumas imagens após o novo processo de MSA. A) Classe representativa com escala de 10 nm, evidenciando que o complexo é composto por seis septinas. B) Diferentes Cclasses representativas do complexo humano SEPT5-SEPT6-SEPT7 obtidas após o alinhamento. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56. Pode-se observar pequenas diferenças entre as imagens, como a flexibilidade do complexo.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Processamento de imagens do complexo SEPT5(MBP)-SEPT6-SEPT7

Com o objetivo de entender a organização do complexo e a localização das septinas no mesmo, foram processadas imagens da construção do complexo com a região N-terminal da SEPT5 fusionada à uma proteína de aproximadamente 43 kDa (MBP: Maltose Binding Protein) em sua extremidade N-terminal. Essa parte do trabalho ainda é continuação das imagens de microscopia eletrônica de transmissão obtidas pelo projeto de pós-doutorado da Dr. Joci Neuby Alves Macedo.

Como o complexo hexamérico contém uma dupla de cada uma das três septinas, neste caso esperamos duas saliências próximas ao complexo, de tamanho parecido à uma septina individual, que corresponderia à MBP. Em relação à posição, era esperado que a MBP aparecesse no meio do hexâmero, visto que a SEPT5

substitui a SEPT2 no complexo modelo pois pertencem ao mesmo grupo de septinas.^{28,37}

Foram coletadas 503 imagens do complexo fusionado à MBP com dimensões 4096 x 4096 pixels e pixel size 1,78 Å. Foram obtidas 73365 imagens na seleção de partículas para o complexo com MBP e possuem o mesmo tamanho de 25 nm de comprimento e 5 nm de largura como observado no complexo sem MBP.

Após os mesmos procedimentos utilizados nos dados anteriores, foi realizado um MSA utilizando novamente uma máscara circular bem espaçosa, excluindo apenas 10% da parte mais externa da imagem. Os resultados desse primeiro MSA estão representados na Figura 25.

Figura 25 - Resultados do primeiro MSA do complexo SEPT5(MBP)-SEPT6-SEPT7. A) Classes representativas alinhadas com a mesma referência dos dados anteriores (Figura 17). B) Máscara e primeiras auto-imagens utilizadas no processo de classificação. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com esse primeiro MSA não foi possível observar com clareza a posição da MBP. Nota-se pelas auto-imagens (Figura 25B) que os fatores mais relevantes para a classificação das partículas foram detalhes internos do próprio complexo. Isso acontece devido à máscara utilizada, que, por ser muito abrangente, faz com que os detalhes de mais baixa frequência seja a característica mais evidente para a classificação.

Para que a MBP fosse o fator mais evidente na imagem na classificação, uma nova máscara foi utilizada com um retângulo do tamanho da septina no centro, de forma que seja anulada a informação do complexo contida na imagem. Os resultados desse novo MSA estão representados na Figura 26.

Figura 26 - Resultados do segundo MSA do complexo SEPT5(MBP)-SEPT6-SEPT7. A) Máscara utilizada na classificação, com um retângulo centralizado dentro do círculo. B) Classes representativas resultantes desse novo processo de MSA. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.

Fonte: Elaborada pela autora.

Pode-se notar com a Figura 26 que a nova máscara utilizada melhorou um pouco a visualização da MBP no complexo, porém, a presença de ruído nas imagens devido à máscara circular ainda muito abrangente pode ter prejudicado a classificação. Por isso foi necessário um novo processo de MSA, dessa vez com uma máscara que limitasse a região externa ao complexo, porém larga o suficiente para que a MBP continuasse aparecendo. Os resultados desse novo ciclo estão representados na Figura 27.

Figura 27 - Resultados do terceiro MSA do complexo SEPT5(MBP)-SEPT6-SEPT7. A) Máscara utilizada na classificação, com um retângulo centralizado dentro de um retângulo maior. B) Classes representativas resultantes desse novo processo de MSA. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.

Fonte: Elaborada pela autora.

As melhores classes desse novo ciclo foram selecionadas e pode-se observar na Figura 27 que a definição da posição da MBP melhorou. Surpreendentemente a MBP não está localizada onde era o esperado, no meio do hexâmero. Aparentemente ela está localizada na extremidade do complexo e pode-se notar uma flexibilidade considerável em seu posicionamento, que pode ser explicada pelo

tamanho do linker entre a MBP e o domínio N-terminal, que possui 14 resíduos de aminoácidos. O fato de estar aparecendo apenas uma MBP por complexo pode ser explicado também devido à essa flexibilidade, onde apenas uma das MBPs é preferencial e fixa para a classificação, a informação da outra é perdida ou amenizada devido à soma das imagens com esta MBP em posições diferentes.

Para mapear a MBP de forma mais clara, sem perder informação da segunda MBP, todas as partículas foram rotacionadas de 180° e uma nova máscara foi criada de forma à anular a informação da metade inferior da imagem, portando só a parte superior ficou disponível para a classificação. Para analisar também a distância da MBP comparada ao complexo, a parte externa superior foi feita novamente mais abrangente. Os resultados estão representados na Figura 28.

Figura 28 - Resultados do último MSA do complexo SEPT5(MBP)-SEPT6-SEPT7. A) Máscara utilizada na classificação, com um retângulo centralizado e metade da imagem coberta. B) Classes representativas resultantes desse processo de MSA. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com esse novo processamento, fica ainda mais evidente a MBP se localizando ao redor da extremidade, sugerindo que a SEPT5 está localizada na extremidade do complexo. Na Figura 29, comparando os três últimos processos de MSA podemos ver também pelas auto-imagens que a informação referente à MBP está bem concentrada na extremidade do complexo.

Figura 29 - Primeiras auto-imagens utilizadas no processo de classificação comparando as três diferentes máscaras utilizadas. Informação da MBP é evidenciada na ponta do complexo humano SEPT5SEPT6-SEPT7. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Imunomarcacão do complexo SEPT5-SEP6-SEPT7

A flexibilidade quanto à localização da MBP observada nos complexos, possivelmente devido ao tamanho do *linker*, impossibilitou a afirmação de que a SEPT5 está localizada no centro do complexo. Por isso, foram feitas novas medidas com anticorpo monoclonal específico para a SEPT5 em complexos não fusionados à MBP. Dessa forma, pode-se confirmar a localização da SEPT5 no complexo.

Para confirmar que a interação do anticorpo com a SEPT5 era específica, foi feito um *Western Blot* com o complexo SEPT5(MBP)-SEPT6-SEPT7, para que a banda correspondente à SEPT5, devido à fusão com MBP, fosse bem diferenciada no gel SDS-PAGE 12%, visto que as septinas possuem pesos moleculares bem próximos (Tabela 2).

Figura 30 - Ensaio de Western Blot do complexo SEPT5-SEPT6-SEPT7 fusionado à MBP com anticorpo anti-SEPT5. A) Em membrana de nitrocelulose com o padrão de massa molecular Precision Plus Protein™ Prestained Standards (BioRad) está indicado do lado esquerdo da imagem em unidades de kDa e a banda correspondente a SEPT5 fusionada à MBP (86 kDa). B) Gel SDS-PAGE da amostra utilizada no Western Blot, mostrando a presença das três septinas SEPT5(MBP), SEPT7, SEPT6 e SEPT7d. Esta última se refere à SEPT7 degradada que pode ser resultado da degradação proteolítica ou terminação prematura.

Fonte: Elaborada pela autora.

O ensaio de *Western Blot*, representado na Figura 30 confirmou a especificidade do anticorpo à SEPT5 (86 kDa devido à fusão com a MBP), visto que a SEPT6 e SEPT7 (49 e 50 kDa, respectivamente) não foram detectadas na membrana de nitrocelulose.

O complexo sem MBP foi expresso em *E. coli* Rosetta (DE3), após co-transformação dessas com os vetores de expressão. Após expressão em 1L de meio LB o complexo passou por cromatografia de afinidade em coluna de níquel e uma segunda purificação por cromatografia de exclusão molecular. Análise por SDS-PAGE 12 % verificou tanto a expressão quanto a solubilidade das proteínas produzidas (Figura 31). A cauda de histidinas N-terminal presente na SEPT7 permitiu a interação das proteínas de interesse ao níquel imobilizado na coluna e a cromatografia de exclusão molecular permitiu a obtenção do complexo de forma homogênea e isolado dos contaminantes, excesso de septinas e agregados proteicos.

Na eluição da purificação por afinidade pode-se observar (Figura 31) a presença das três proteínas, porém, com alguns contaminantes. No gel SDS da cromatografia de exclusão molecular (Figura 34) pode-se ver que nos volumes de 7

a 11 mL há também a presença das três proteínas SEPT5, SEPT6 e SEPT7, porém, devido ao peso molecular muito próximo, as bandas correspondentes à SEPT6 e SEPT7 não são separadas no gel SDS. A presença de uma quarta banda no gel de SDS aparece devido à degradação da SEPT7 (SEPT7d), assim como na purificação do hexâmero fusionado à MBP, observada também na literatura, possuindo um peso molecular menor que pode ser resultado da degradação proteolítica ou terminação prematura.²³⁻²⁷

No perfil da exclusão molecular (Figura 33) observa-se que a amostra foi eluída nos volumes de 6 a 18 mL, porém, não na forma de um único pico simétrico, mas sim, uma série de picos parcialmente resolvidos, indicando a presença de diferentes formas oligoméricas do complexo. O pico principal, centrado em um volume de eluição de 8,5ml, apresentava um perfil simétrico e foi utilizado para os experimentos de microscopia. Como as septinas não são globulares, é difícil afirmar o tamanho do complexo através do perfil de eluição. Por isso, a presença do complexo foi confirmada com a própria microscopia.

Figura 31 - SDS-PAGE 12 % do perfil de expressão e purificação por cromatografia de afinidade ao níquel imobilizado do complexo SEPT5-SEPT6-SEPT7. O padrão de massa molecular, em kDa, está indicado à esquerda da imagem. A) Fração insolúvel após lise celular; B) Fração solúvel; C) Fração solúvel após passagem pela resina de afinidade; D) e E) Eluato das etapas de lavagem da coluna com tampão contendo Triton 0,1% mM e 5 mM de imidazol, respectivamente; F) Proteínas eluídas com tampão contendo 400 mM de imidazol; G) Eluato da cromatografia de afinidade concentrada, antes da aplicação em coluna de exclusão molecular, indicada ao lado direito as septinas correspondentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 32 - SDS-PAGE 12 % do perfil de cromatográfico em coluna de exclusão molecular Superdex 200 do complexo SEPT5-SEPT6-SEPT7. O padrão de massa molecular, em kDa, está indicado à esquerda da imagem. A) Eluato da cromatografia de afinidade concentrada, antes da aplicação em coluna de exclusão molecular; B) Fração coletada de 6 a 7 mL; C) Fração coletada de 7 a 8 mL D) Fração coletada de 8 a 9 mL E) Fração coletada de 9 a 10 mL; F) Fração coletada de 10 a 11 mL; G) Mesmo que Fração D representando ao lado direito as septinas correspondentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 33 - Cromatograma do complexo proteico SEPT5-SEPT6-SEPT7 em coluna de exclusão molecular Superdex 200 com fracionamento de 1 mL. A fração coletada de 8 a 9 mL foi utilizada para a imunomarcação e análise em negative stain.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após purificação, a Fração 8 de 0,8 mg/mL obtida da cromatografia de exclusão molecular (Figura 33, que corresponde ao complexo hexamérico, foi incubada com excesso de anticorpo monoclonal anti-sept5 de 1 mg/mL (diluição 55:1) por 2h no gelo e então congelada em nitrogênio e armazenada a -80 °C.

Foram preparadas grades do complexo hexamérico com anticorpo por contrastação negativa e analisadas por TEM. Aproximadamente 900 micrografias foram coletadas no FEI-Talos F200C TEM (200 kV) para futuro processamento de imagens. Entretanto, nas próprias micrografias podemos ver a posição do anticorpo, visto que seu peso molecular possui um valor considerável (150 kDa).

Um anticorpo IgG é composto de três porções de tamanhos similares e organizado em forma de Y. Há duas partes variáveis que são capazes de se ligar ao antígeno. Portanto, nas micrografias podemos ver alguns anticorpos interagindo com um complexo de septina e eventualmente, duas septinas ao mesmo tempo. Na Figura 34 podemos observar a heterogeneidade da amostra devido ao excesso de anticorpo, além das diferentes maneiras que este pode interagir com o complexo hexamérico.

Figura 34 - Representação de uma das micrografias do complexo hexamérico humano SEPT5-SEPT6-SEPT7 marcado com anticorpo anti-sept5

Fonte: Elaborada pela autora.

Algumas micrografias foram recortadas e aumentadas para que fosse possível uma melhor visualização dos complexos e a localização do anticorpo na interação, assim como mostra a Figura 35.

Figura 35 - Imagens recortadas das micrografias do complexo hexamérico humano SEPT5-SEPT6-SEPT7 com anti-sept5. A) Imagem representativa do complexo com dois anticorpos. Barra de escala de 30 nm. B) Imagens recortadas de diversas micrografias, demonstrando as diferentes formas de interação do anticorpo. As imagens possuem 300 x 300 pixels.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 35 claramente podemos observar o anticorpo anti-sept5 interagindo com as extremidades do complexo hexamérico, confirmando os dados obtidos para o complexo fusionado à MBP. Na Figura 36 estão representadas as diferentes estruturas formadas devido à interação do anticorpo com o complexo hexamérico.

Figura 36 - Diferentes estruturas da interação com anticorpo e complexo de septinas. A) Imagens selecionadas de diferentes estruturas formadas pelo anticorpo e septinas observadas por MET. B) Localização do anticorpo (círculo) e do complexo hexamérico (retângulo) nas imagens de MET. C) Representação esquemática das estruturas observadas, com anticorpos em laranja e complexo hexamérico em cinza.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na primeira imagem da Figura 36A, B e C, está representada uma das estruturas possíveis proveniente da interação do complexo com o anticorpo, onde dois anticorpos estão ligados às extremidades do complexo hexamérico de septinas. Na segunda linha podemos ver outro exemplo, com apenas um anticorpo interagindo com uma das extremidades do complexo. Na terceira linha dois complexos são unidos paralelamente devido à ligação de cada um dos anticorpos à duas septinas ao mesmo tempo e nas duas extremidades. Já na última linha, há a representação de um anticorpo ligando-se à dois complexos de septinas ao mesmo tempo.

Devido à presença das diversas estruturas aqui mostradas, o processamento para a posterior obtenção de classes dessas imagens é mais desafiador, sendo inviável sua realização durante o período deste projeto.

4.4 Processamento de imagens do complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 de *Ciona intestinalis*

O complexo do organismo *Ciona intestinalis* também foi estudado neste projeto, com o objetivo de confirmar que as quatro septinas que o organismo possivelmente expressa, interagem entre si, formando um complexo octamérico. Esta parte do trabalho foi realizada pelo processamento de dados das imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos complexos obtidos pelo projeto de doutorado da Me. Sinara Teixeira do Brasil Moraes. As grades foram montadas com os complexos em tampão a 500 mM NaCl, impedindo a polimerização para formação de filamentos.²⁷

Foram coletadas 352 imagens do complexo com dimensões 4096 x 4096 pixels e pixel size 1,78 Å, uma das micrografias está representada na Figura 37.

Figura 37 - Representação de uma das micrografias do complexo de *Ciona intestinalis* SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 utilizada no processamento de imagens, com dimensões 4096 x 4096 pixels e pixel size de 1,78. Barra de escala de 100 nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

No processo de picking, foram obtidas 75582 imagens de 160 x 160 pixels na seleção de partículas para o conjunto de dados contendo o complexo. As partículas foram alinhadas rotacionalmente com uma referência obtida em processamentos anteriores do mesmo conjunto de dados.

O primeiro MSA foi feito com uma máscara retangular um pouco maior que o complexo e classes que contém aproximadamente 20 imagens. As classes obtidas estão representadas na Figura 38.

Figura 38 - Representação de algumas classes representativas do complexo de *Ciona intestinalis* após o alinhamento rotacional e primeiro processo de MSA. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 38 pode-se notar a presença de moléculas circulares que podem ser contaminantes ou agregados proteicos. Como essas estruturas estavam bem presentes na amostra, o processamento das imagens foi significativamente influenciado pelas mesmas. Na Figura 39 podemos observar essa influência na auto-imagens, onde essa estrutura é bem evidente.

Figura 39 - Primeiras auto-imagens utilizadas no processo de classificação. Informação da estrutura circular contaminante é evidenciada no centro da segunda auto-imagem. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para retirar as imagens que contém essa estrutura circular contaminante, foi feita uma nova classificação utilizando apenas a segunda auto-imagem e as novas classes foram ordenadas pelo peso dessa auto-imagem em cada classe. Dessa forma, as imagens que contém essa estrutura seriam bem separadas das imagens contendo o complexo de *C. intestinalis* e assim foi possível excluir as mesmas.

Com um novo conjunto de partículas contendo apenas o complexo de septinas de *C. intestinalis*, foi feito um novo ciclo de MSA contendo aproximadamente 20 imagens por classe e a mesma máscara retangular. As novas classes obtidas estão representadas na Figura 40.

Figura 40 - Representação de algumas imagens após o novo processo de MSA. A) Classe representativa evidenciando que o complexo é composto por seis septinas. B) Classes representativas do complexo de *C. intestinalis*. Cada imagem possui 160 x 160 pixels e pixel size de 3,56.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar da expressão e purificação das quatro septinas de *C. intestinalis* SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT9, podemos contar seis septinas nas classes obtidas representadas na Figura 40 e o tamanho desse complexo é compatível com o complexo SEPT5-SEPT6-SEPT7 humano. Portanto concluímos com os dados obtidos que o complexo formado é hexamérico.

5 DISCUSSÃO

5.1 Complexo humano SEPT5-SEPT6-SEPT7

Na primeira parte dos resultados foi possível observar que o complexo formado pelas SEPT5, SEPT6 e SEPT7 formam um hexâmero. Este resultado era esperado pois a SEPT5 pertence ao mesmo grupo da SEPT2, que também forma um hexâmero com a SEPT6 e SEPT7. Segundo às Regras de Kinoshita, a SEPT5, por pertencer ao mesmo grupo que a SEPT2, substitui a mesma posição, realizando as mesmas interações no complexo humano modelo.

Além disso o tamanho em comprimento de 25 nm das classes obtidas equivale ao comprimento do hexâmero SEPT2-SEPT6-SEPT7 inferido pela estrutura cristalográfica.²⁷ As septinas podem também ser bem diferenciadas nas imagens, sendo possível a contagem de seis septinas contidas no complexo.

Neste conjunto de dados foi observado a importância do alinhamento rotacional das imagens, para que todas as partículas se posicionassem na mesma direção, de forma que informações de mais alta frequência fossem mais evidentes no processo de classificação, obtendo então classes mais definidas. Para a localização da SEPT5 no complexo, as imagens de MET contendo a mesma fusionada à MBP também foram processadas. Devido à flexibilidade da posição da MBP em relação ao complexo, possivelmente devido ao tamanho do *linker* comentado nos resultados, foi importante utilizar uma máscara retangular que anulasse a informação do complexo de septina para o processo de classificação, de forma que apenas a MBP fosse considerada.

Em todas as diferentes estratégias utilizadas neste processamento, foi observado que a localização da MBP estava em torno da extremidade do complexo de septinas, indicando que a SEPT5 está localizada na extremidade do complexo, não no centro, diferente do que era esperado. O trabalho original que descreveu a organização do hexâmero afirma o seguinte arranjo: SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7, que sugere que SEPT5 (que substitui SEPT2) deveria ocupar a posição central, em contradição às nossas observações experimentais.

Com a dúvida gerada devido à flexibilidade da MBP ao redor do hexâmero, para confirmar que a SEPT5 está localizada na extremidade, foi utilizado um anticorpo específico para SEPT5 no complexo sem MBP. O anticorpo possui aproximadamente 150 kDa e por isso, nas próprias micrografias foi possível observar sua localização com facilidade. O processamento das imagens está em andamento, porém não foi possível concluir a tempo do término deste projeto devido à dificuldade de processamento neste conjunto de dados especificamente, pela heterogeneidade da amostra e as diferentes estruturas formadas provenientes da interação do anticorpo com o oligômero. Entretanto, com as micrografias foi possível confirmar a localização da SEPT5 na extremidade do complexo, como pode-se observar na Figura 35. Com os resultados obtidos e as interações observadas no trímero evidenciadas na estrutura cristalográfica podemos propor que o hexâmero do complexo de septinas humanas SEPT5-SEPT6-SEPT7 está organizado como mostrado na Figura 41. Desta forma a SEPT5 encontra-se nas extremidades do hexâmero, expondo uma interface NC, diferente do hexâmero proposto anteriormente que tem SEPT7 nas extremidades expondo uma interface G.

Figura 41 - Comparação entre posição das septinas humanas no complexo SEPT5-SEPT6-SEPT7. A) Arranjo proposto com os resultados obtidos neste projeto. B) Arranjo proposto por Sirajuddin *et al* com a substituição da SEPT2 por SEPT5, seguindo as Regras de Kinoshita.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar dos avanços no estudo sobre septinas nos últimos anos, o mecanismo de polimerização e interações entre septinas ainda não é bem compreendido. Com os resultados obtidos, foi possível formular uma hipótese ao analisar um padrão

entre a posição dos *coiled coil* e a relação com formação dos heterocomplexos em alta concentração de sal, comparando os complexos de septinas já conhecidos de outros organismos.

De forma geral, se pensarmos apenas na força entre as interações, sabe-se que as interações através da interface NC são realizadas por pontes salinas (Figura 8). Em alta concentração de sal (condição na qual os hexâmeros são observados), o aumento da força iônica na solução pode desestabilizar essas interações, fazendo com que o filamento se decomponha em heterocomplexos devido à quebra da interface NC mais fraca. É menos provável romper o filamento numa interface G, que não é dominada por pontes salinas.

Pode-se avaliar a estabilidade das interações para cada interface utilizando os programas PISA e PDBsum (EBI). As análises foram feitas em colaboração com Dr. Humberto D'Muniz Pereira. Na Figura 42 estão representados os resultados para as interações da interface NC entre SEPT3-SEPT3 e as interações da interface G entre SEPT2-SEPT6, que representam os melhores modelos cristalográficos disponíveis para cada tipo de interface. Na Figura 42A, os resultados do PISA mostram uma maior estabilidade da interface G comparada à interface NC. No caso da interface NC, há um valor positivo de Delta G, indicando ausência de interações hidrofóbicas, ao passo que o número de pontes salinas é maior. Além disso, a área de contato e a energia de ligação na interface NC são também menores que a interface G, confirmando que a interface NC é mais instável, e também, mais propensa à ruptura em alta concentração salina devido ao maior número de pontes salinas. Na Figura 42B também pode-se visualizar que a interface NC é dominada por interações entre resíduos ácidos, básicos e polares (bolas vermelhas, azuis e verdes), enquanto que na interface G há uma variedade maior de tipos de interação.

Figura 42 - Análise da estabilidade das interações PISA e PDBsum para as interfaces NC e G, entre SEPT3-SEPT3 e SEPT2-SEPT6, respectivamente. A) Resultado do programa PISA, onde pode-se observar menor estabilidade da interação na interface NC. B) Resultado do programa PDBsum onde pode-se observar quantidade maior de interações iônicas na interface NC.

Fonte: Elaborada pela autora.

Entretanto, ao longo do filamento existem diferentes tipos de interface NC, principalmente devido ao tamanho do *coiled coil*. Esta estrutura possui um papel importante na estabilidade das interações através dessa interface. Em um filamento contendo septinas representantes de cada grupo (por exemplo septinas 2,6,7 e 9), é esperado que a interação mais fraca corresponda à interface com o menor *coiled coil* ou com a ausência do mesmo, como no caso do Grupo I (representada pela cor verde na Figura 43).

Figura 43 - Hipótese do local de ruptura do filamento em caso de solução com alta força iônica para o complexo modelo formado pelas SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT9, baseado na estabilidade do *coiled coil* das interfaces NC que estão representados por retângulos verticais, evidenciando os diferentes tamanhos dessa estrutura.

Fonte: Elaborada pela autora.

Porém, o complexo estudado neste projeto possui apenas três septinas, com septinas do Grupo I ausentes. Aplicando o mesmo raciocínio para este caso, espera-se que a interface mais fraca seja a interface NC com o menor *coiled coil*. O complexo gerado possui a mesma montagem que foi observada nos resultados obtidos, produzindo um hexâmero centrado na interface G entre SEPT7-SEPT7 (representante único do Grupo IV, amarelo), com a extremidade NC do Grupo III, vermelho, exposta, como mostra a Figura 44. É interessante notar que dados experimentais recentes do nosso grupo (ainda não publicados) sugerem que o *coiled coil* entre duas cópias de septinas do grupo III (vermelho) pode ser antiparalelo formando ligações cruzadas entre filamentos e, portanto, não contribuindo para a estabilidade da interface NC. Complementarmente, Bertin *et al.* mostra que, em leveduras, o *coiled coil* da septina cdc11 (análoga à septinas do grupo III, vermelho) não é essencial para a formação de filamentos, indicando que a interação através da interface NC cdc11-cdc11 pode ser fraca pois não há contribuição do *coiled coil*.⁵⁹

Figura 44 - Hipótese do local de ruptura do filamento em caso de solução com alta força iônica, baseado na estabilidade do coiled coil das interfaces NC, no caso sem septinas do Grupo I.
Fonte: Elaborada pela autora.

Como dito anteriormente, estudos já relataram que a interação entre o domínio C-terminal da SEPT6 com SEPT7, que possuem o maior coiled coil, é muito mais estável que o coiled-coil homodimérico formado pela SEPT2 (Grupo III, vermelho), que é menor, o que é coerente com a hipótese e os dados obtidos neste projeto. Além disso, realizando uma série de mutações e experimentos de gel filtração analítica, Zent et al. encontraram que a interface G da SEPT7 é mais estável a concentrações de sal elevadas do que SEPT2, novamente sugerindo que é improvável que o filamento se desfaça na interface G entre duas cópias da SEPT7, como proposto originalmente^{19,60}

Em relação à levedura, há uma interface NC na extremidade do complexo octamérico, coerente com a hipótese de que esse tipo de interface é mais sensível à alta concentração de sal. Porém, é interessante notar que no caso octamérico de leveduras, a septina que está localizada no centro do complexo (Cdc10) é similar à SEPT9 humana, participando do mesmo grupo, com a característica de não possuir *coiled coil*.⁵ Portanto a ruptura ocorre entre septinas do Grupo III (vermelho), que possuem um pequeno *coiled coil*. Entretanto, a localização da SEPT9 no complexo octamérico humano é relatada na extremidade da montagem. Na Figura 15 e Figura 45 podemos ver como o complexo humano parece estar invertido em relação ao complexo de levedura. Portanto, a ruptura na interface NC do *coiled coil* pequeno

(como estamos propondo para o complexo SEPT5-SEPT6-SEPT7) já foi visto no caso de levedura.

Figura 45 - Comparação entre complexo octamérico de septina humano (acima) e de levedura (abaixo).
Fonte: Elaborada pela autora.

Outro fato interessante é que estudos *in vivo* com o caso de leveduras na ausência da Cdc10 (análoga ao Grupo I, verde), obtém-se um hexâmero compatível ao obtido neste projeto, com septinas análogas ao Grupo III (vermelho) na extremidade e a septina central, cdc3, interage com ela mesma, formando um arranjo de complexo hexamérico similar ao complexo proposto, representado na Figura 46.⁵⁹

Figura 46 - Hexâmero de levedura é formado na ausência de Cdc10, com interface de septina análoga ao Grupo III exposta.
Fonte: Elaborada pela autora.

Pode-se também comparar os dados obtidos com o complexo de *C. elegans*, representado na Figura 15. Neste organismo o complexo é tetramérico, formado pelas septinas UNC59 e UNC61, e a extremidade exposta é uma interface G, o que parece não corroborar com a hipótese deste projeto. Porém, este tetrâmero pode ter

uma dinâmica diferente do complexo estudado devido à presença de apenas duas septinas. Além disso, o tamanho do *coiled coil* de *C. elegans* é comparável ao *coiled coil* de septinas do grupo da SEPT6 e SEPT7 humanas, que é o mais longo e mostrou ser o mais estável.

É interessante notar que os heterodímeros formados pela interface NC com o maior *coiled coil* (SEPT6-SEPT7 em humanos, cdc3-cdc12 em levedura e UNC59-UNC61 em *C. elegans*) parecem ser uma espécie de “núcleo” dos filamentos. McMurray *et al* mostram que as células de levedura com a ausência de cdc10 ou cdc11 ainda são capazes de realizar a divisão celular, pois as septinas podem formar novas interfaces, viabilizando a polimerização em filamentos e sugerindo que cdc3 e cdc12 representam um núcleo fundamental para o filamento. Além disso, é sabido que apenas essas duas septinas (cdc3 e cdc10) de um total de cinco em leveduras, é essencial para o crescimento mitótico.⁵⁹

Estes dados sugerem que o par de septinas que interagem através de um *coiled coil* longo, tanto em humanos, quanto em leveduras, é essencial e que provavelmente este seja muito estável e difícil de se desfazer. Portanto, fazendo uma analogia com o complexo de *C. elegans*, é possível que a alta concentração de sal seja suficiente para desestabilizar uma interface G, que é a interface exposta, porém não o suficiente para quebrar o *coiled coil* formado.

A comparação com o caso do complexo hexamérico humano SEPT2-SEPT6-SEPT7 estudado por Sirajuddin *et al.* é a mais intrigante, visto que ele é composto por septinas do mesmo grupo do complexo estudado neste projeto, porém, foi relatado um arranjo inverso quando comparado com os dados obtidos para o complexo SEPT5-SEPT6-SEPT7, com a interface G da SEPT7 exposta. Entretanto, os dados publicados utilizando MET para determinar a posição da SEPT2 fusionada à MBP neste complexo não são conclusivas, devido à incerteza nas classes obtidas por análise de partícula única e a heterogeneidade e instabilidade da amostra relatada neste estudo (Figura 13).²⁷ Os dados apresentados nesta dissertação são, a nosso ver, mais conclusivos.

Mesmo assim, seria interessante futuramente repetir o experimento utilizando marcação com anticorpo para comparar o complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7 relatado por Sirajuddin *et al.* com os resultados obtidos do complexo SEPT5-SEPT6-SEPT7 neste projeto.

Apesar dos dados obtidos mostrarem uma outra formação do complexo hexamérico, alterando a forma como a montagem do filamento é vista e proporcionando um novo entendimento sobre as interfaces e sua estabilidade, o filamento de mais alta ordem não muda em nada, seguindo ainda a mesma sequência de septinas baseada na divisão entre os quatro grupos. Também é importante ressaltar que a posição das outras septinas, que não foram marcadas nos experimentos realizados neste projeto, possuem a posição conhecida devido à comparação com a estrutura cristalográfica do trímero de SEPT2, SEPT6 e SEPT7 mostrada no estudo de Sirajuddin *et al.*

5.2 Complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 de *Ciona intestinalis*

A hipótese de que as septinas de *Ciona intestinalis* formariam um octâmero se deve ao fato de que esse organismo possui apenas quatro genes que codificam septinas e cada um desses genes é representante de cada grupo de septinas por similaridade de sequência. Entretanto, não há dados estruturais na literatura sobre as septinas desse organismo.

O processamento de imagens dos dados obtidos mostrou que o complexo é formado por seis septinas, como pode-se contar na Figura 40. Além disso o comprimento do complexo nas classes obtidas possui aproximadamente 25 nm, equivalente ao tamanho de um hexâmero. O tamanho esperado para um octâmero é de 32 nm, como foi demonstrado para o octâmero de levedura (Figura 12).

Na purificação realizada durante o projeto de doutorado da Me. Sinara T. do B. Moraes a SEPT9 e SEPT7 são co-expressas, enquanto SEPT2 e SEPT6 são produzidas separadamente, sendo depois unidas para a seguinte cromatografia de exclusão molecular. Por isso, pode ser que alguma delas, provavelmente a SEPT2 ou SEPT6, não esteja participando do complexo. Um experimento não publicado de espectrometria de massas mostra que todas as septinas estão presentes na preparação, porém, há uma baixa cobertura de sinal da SEPT2.

É possível que haja uma mistura de hexâmeros e octâmeros, com uma frequência menor de octâmeros, fazendo com que estes não tenham sido evidentes no processamento das imagens. Essa heterogeneidade contendo octâmeros e hexâmeros, com a presença de quatro septinas de cada grupo, foi relatado por Sellin

et al para complexos de septinas humanas contendo SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT9 por contrastação negativa utilizando MET.³² Adicionalmente, no caso de leveduras, foi mostrado que na falta de *cdc11*, que se localiza na extremidade do octâmero e é análoga ao grupo da SEPT2 humana, ainda há a formação de hexâmeros, corroborando com a hipótese de que a SEPT2 de *C. intestinalis* pode estar ausente no complexo.^{29,37}

Devido à falta de anticorpos específicos para as septinas de *C. intestinalis*, não foi possível mapear a localização das septinas no complexo hexamérico. Como a SEPT7 possui uma cauda de histidina para a purificação por cromatografia de afinidade, é possível mapear a SEPT7 com um anticorpo anti-His. Outro experimento possível é fusionar cada uma das septinas com outra proteína de massa molecular suficiente para ser observada por TEM, como a MBP ou GFP.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão realizados com o complexo de septinas humanas SEPT5-SEPT6-SEPT7 apresentados no presente projeto, pode-se concluir que este conjunto de septinas gera um complexo hexamérico do tipo SEPT5-SEPT6-SEPT7-SEPT7-SEPT6-SEPT5, com uma interface NC exposta, invertido em relação ao complexo análogo presente na literatura, composto pelas septinas humanas SEPT2-SEPT6-SEPT7, com uma interface G exposta.

Com este resultado, ao comparar com outros estudos sobre complexos de septinas de outros organismos e estudos sobre a estabilidade das interações entre as interfaces G e NC, foi possível formular a hipótese de que a interface NC que contém *coiled coil* menores ou ausentes, são mais instáveis à alta concentração de sal na solução e mais propensas à ruptura, limitando a polimerização em filamentos de alta ordem em hetero-complexos. Isto muda a forma de se pensar atualmente sobre a montagem de filamentos de septinas a partir dos seus componentes monoméricos.

Para o complexo de *Ciona intestinalis*, é interessante realizar novos experimentos também com marcações com anticorpo ou fusão com outras proteínas de forma que seja possível localizar e entender como as septinas deste organismo estão formando o complexo hexamérico observado nos resultados apresentados neste projeto e entender melhor a contradição entre resultados bioquímicos e de microscopia. Estes resultados são interessantes para a compreensão da montagem dos filamentos de septinas e estabilidade de suas interações, ao passo que surgem alguns questionamentos sobre complexos, não só hexaméricos, mas também octaméricos, devido à falta de informação estrutural sobre os mesmos e a falta de informações sobre suas dinâmicas de auto-montagem.

A microscopia eletrônica por contrastação negativa se mostrou essencial para a compreensão desses fatores. Para aprofundar e comprovar a hipótese da instabilidade das interfaces NC e organização dos complexos, é interessante repetir o mesmo experimento com anticorpos para o complexo formado por SEPT2, SEPT6 e SEPT7. Adicionalmente estender para outros complexos como SEPT5-SEPT8-SEPT7, ou SEPT4-SEPT6-SEPT7, e também para complexos octaméricos como

SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 para verificar se há um padrão de organização e se também está invertida em relação ao que já foi sugerido na literatura.

Além de poder explorar esses aspectos com outros complexos, estudo utilizando crio-microscopia eletrônica para a obtenção de micrografias de melhor resolução, para gerar estruturas 3D a nível atômico destes complexos, se tornou um desafio para um futuro mais próximo. Essa alternativa pode solucionar a dificuldade em obter cristais de complexo de septinas para experimentos de difração com raio-X.

REFERÊNCIAS

- 1 HARTWELL, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast DNA replication department of genetics. **Journal of Molecular Biology**, v. 59, n. 1. p. 183–194, 1971.
- 2 LONGTINE, M. S. et al. The septins: roles in cytokinesis and other processes. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, n. 1, p. 106–119, 1996.
- 3 BYERS, B.; GOETSCH, L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. **Journal of Cell Biology**, v. 69, n. 3, p. 721–732, 1976.
- 4 GLADFELTER, A. S.; PRINGLE, J. R.; LEW, D. J. The septin cortex at the yeast mother – bud neck. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 681–689, 2001.
- 5 PAN, F.; MALMBERG, R. L.; MOMANY, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 103, p. 1–17, 2007. doi:10.1186/1471-2148-7-103.
- 6 MCILHATTON, M. A. et al. Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septin gene on chromosome 17q25.3. **Oncogene**, v. 20, n. 41, p. 5930–5939, 2001.
- 7 HALL, P. A. et al. Expression profiling the human septin gene family. **Journal of Pathology**, v. 206, n. 3, p. 269–278, 2005.
- 8 CAO, L. et al. Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. **FEBS Letters**, v. 581, n. 28, p. 5526–5532, 2007.
- 9 MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 183–94, 2012.
- 10 CAUDRON, F.; BARRAL, Y. Septins and the lateral compartmentalization of eukaryotic membranes. **Developmental Cell**, v. 16, n. 4, p. 493–506, 2009.
- 11 ANGELIS, D. & SPILIOTIS, E. T. Septin mutations in human cancers. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 4, n. 122, p. 1–17, 2016.
- 12 HALL, P. A.; RUSSELL, S. E. H. The pathobiology of the septin gene family. **Journal of Pathology**, v. 204, n. 4, p. 489–505, 2004.
- 13 IHARA, M. et al. Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 26, p. 24095–24102, 2003..
- 14 MARTINS, C. S. **Análise das interfaces de interação septina-septina**. 2017. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
- 15 BERTIN, A.; MCMURRAY, M. A.; THAI, L. SI: Phosphatidylinositol-4, 5- bis phosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. **Journal of Molecular Biology**, v. 404, n. 4, p. 711–731, 2010.

- 16 ZHANG, J. et al. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. **Current Biology**, v. 9, n. 24, p. 1458–1467, 1999.
- 17 GARCIA, W. et al. Dissection of a human septin: definition and characterization of distinct domains within human SEPT4. **Biochemistry**, v. 45, n. 46, p. 13918–13931, 2006.
- 18 ZERAIK, A. E. et al. Crystal structure of a *Schistosoma mansoni* septin reveals the phenomenon of strand slippage in septins dependent on the nature of the bound nucleotide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 11, p. 7799–7811, 2014.
- 19 VALADARES, N. F. et al. Septin structure and filament assembly. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 5, 2017. doi:10.1007/s12551-017-0320-4.
- 20 LEIPE, D. D. et al. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. **Journal of Molecular Biology**, v. 317, n. 1, p. 41–72, 2002.
- 21 SARASTE, M.; SIBBALD, P. R.; WITTINGHOFER, A. The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, n. 11, p. 430–434, 1990.
- 22 KARTMANN, B. & ROTH, D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 114, , Pt. 5, p. 839–844, 2001.
- 23 VALADARES, N. F.; GARRATT, R. C. Septin crystallization for structural analysis. **Methods in Cell Biology**, v. 136, p. 321, 2016. doi: 10.1016/bs.mcb.2016.03.017.
- 24 JOHN, C. M. et al. The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. **EMBO Journal**, v. 26, n. 14, p. 3296–3307, 2007.
- 25 MACEDO, J. N. A. **Estudos estruturais e funcionais de septinas humanas: a ligação e hidrólise de GTP por SEPT3 e a busca de parceiros funcionais de SEPT1, SEPT5 e SEPT7**. 2010. 160 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 26 SALA, F. A. et al. Heterotypic coiled-coil formation is essential for the correct assembly of the septin heterofilament. **Biophysical Journal**, v. 111, n. 12, p. 2608–2619, 2016.
- 27 SIRAJUDDIN, M. et al. Structural insight into filament formation by mammalian septins. **Nature**, v. 449, n. 7160, p. 311–317, 2007.
- 28 FIELD, C. M. et al. A purified drosophila septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. **Journal of Cell Biology**, v. 133, n. 3, p. 605–616, 1996.
- 29 FRAZIER, J. A. et al. Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. **Journal of Cell Biology**, v. 143, n. 3, p. 737–749, 1998.
- 30 KIM, M. **Regulation of septin complex assembly and roles in cytokinesis and ciliogenesis**. 2014. 226 p. Ph. D. Thesis (Physics) - Department of Biochemistry, University of Toronto, Toronto, 2014.

- 31 MARQUES, I. A. et al. Septin C-Terminal domain interactions: implications for filament stability and assembly. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 62, n. 2, p. 317–328, 2012.
- 32 SELLIN, M. E. et al. Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 11, 2011. doi:10.1091/mbc.E11-03-0253.
- 33 SANDROCK, K. et al. Characterization of human septin interactions. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 8–9, p. 751–761, 2011.
- 34 KIM, M. S. et al. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. **Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 5, p. 815–826, 2011.
- 35 NAKAHIRA, M. et al. A draft of the human septin interactome. **PLoS One**, v. 5, n. 11, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0013799.
- 36 KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. **Journal of Biochemistry**, v. 134, n. 4, p. 491–496, 2003.
- 37 BERTIN, A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 24, p. 3152, 2008.
- 38 SADIAN, Y. et al. The role of Cdc42 and Gic1 in the regulation of septin filament formation and dissociation. **Elife**, v. 2013, n. 2, p. 1–26, 2013.
- 39 KINOSHITA, M. et al. Self- and actin-templated assembly of mammalian septins. **Developmental Cell**, v. 3, n. 6, p. 791–802, 2002.
- 40 WEIRICH, C. S.; ERZBERGER, J. P.; BARRAL, Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 478–489, 2008.
- 41 MERK, A. et al. Breaking Cryo-EM resolution barriers to facilitate drug discovery. **Cell**, v. 165, n. 7, p. 1698–1707, 2016.
- 42 DENT, J. et al. A prototypic platelet septin and its participation in secretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 5, p. 3064–3069, 2002.
- 43 BLÄSER, S. et al. Isolation of new splice isoforms, characterization and expression analysis of the human septin SEPT8 (KIAA0202). **Gene**, v. 312, n. 1–2, p. 313–320, 2003.
- 44 MARTÍNEZ, C. et al. Platelet septin complexes form rings and associate with the microtubular network. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, n. 6, p. 1388–1395, 2006.

- 45 NEUBAUER, K.; ZIEGER, B. The mammalian septin interactome. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 5, p. 1–9, 2017. doi: 10.3389/fcell.2017.00003.
- 46 FRANK, J. **Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies**. Oxford: Oxford University Press, 2006
- 47 RIGHETTO, R. D. **Validation of structural heterogeneity in Cryo-EM datasets by cluster ensembles**. 2014. 191 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014
- 48 PORTUGAL, R. V. **Estudos de complexos macromoleculares por crio-microscopia eletrônica e técnicas biofísicas**. 2006 153 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- 49 GRIGORIEFF, N. Direct detection pays off for electron cryo-microscopy. **Elife**, v. 2013, n. 2, p. 2–4, 2013
- 50 VAN HEEL, M. et al. Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 33, n. 4, p. 307-369, 200.
- 51 SÖDERLUND, H.; BONSDORFF, C-H. von; ULMANEN, I. Comparison of the structural properties of Sindbis and Semliki Forest virus nucleocapsids. **Journal of General Virology**, v. 45, n. 1, p. 15–26, 1979.
- 52 ADRIAN, M. et al. Cryo-electron microscopy of viruses. **Nature**, v. 308, n. 5954, p. 32–36, 1984.
- 53 LYUMKIS, D. et al. Automation in single-particle electron microscopy: connecting the pieces. **Methods in Enzymology**, v. 483, p. 291-228, 2010. doi: 10.1016/S0076-6879(10)83015-0.
- 54 WILLIAMS, D. B.; CARTER, C. B. **Transmission electron microscopy: a textbook for materials science**. Berlin: Springer, 2009.
- 55 AFANASYEV, P. et al. Single-particle cryo-EM using alignment by classification (ABC): the structure of *Lumbricus terrestris* haemoglobin. **IUCrJ**, v. 4, n. 5, p. 678–694, 2017.
- 56 VAN HEEL, M.; FRANK, J. Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules. **Ultramicroscopy**, v. 6, n. 1, p. 187–194, 1981.
- 57 VAN HEEL, M.; STÖFFLER-MEILICKE, M. Characteristic views of *E. coli* and *B. stearothermophilus* 30S ribosomal subunits in the electron microscope. **EMBO Journal**, v. 4, n. 9, p. 2389–2395, 1985.
- 58 VAN HEEL, M. et al. A new generation of the IMAGIC image processing system. **Journal of Structural Biology**, v. 116, n. 1, p. 17–24, 1996
- 59 MCMURRAY, M. A. et al. Septin filament formation is essential in budding yeast. **Developmental Cell**, v. 20, n. 4, p. 540–549, 2012.

60 ZENT, E.; WITTINGHOFER, A. Human septin isoforms and the GDP-GTP cycle. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 2, p. 169–180, 2014.